

**Titre:** Détermination de la toxicité à long-terme du zinc sur la diversité fonctionnelle enzymatique de sols contaminés collectés sur le terrain  
**Title:**

**Auteur:** Isabelle Lessard  
**Author:**

**Date:** 2013

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Lessard, I. (2013). Détermination de la toxicité à long-terme du zinc sur la diversité fonctionnelle enzymatique de sols contaminés collectés sur le terrain  
**Citation:** [Ph.D. thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
<https://publications.polymtl.ca/1263/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:**  
PolyPublie URL: <https://publications.polymtl.ca/1263/>

**Directeurs de recherche:** Louise Deschênes, & Sébastien Sauvé  
**Advisors:**

**Programme:** Génie chimique  
**Program:**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ À LONG-TERME DU ZINC SUR  
LA DIVERSITÉ FONCTIONNELLE ENZYMATIQUE  
DE SOLS CONTAMINÉS COLLECTÉS SUR LE TERRAIN

ISABELLE LESSARD

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR  
(GÉNIE CHIMIQUE)

NOVEMBRE 2013

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ À LONG-TERME DU ZINC SUR LA  
DIVERSITÉ FONCTIONNELLE ENZYMATIQUE  
DE SOLS CONTAMINÉS COLLECTÉS SUR LE TERRAIN

présentée par : LESSARD Isabelle

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme DORNER Sarah, Ph.D., présidente

Mme DESCHÊNES Louise, Ph.D., membre et directrice de recherche

M. SAUVÉ Sébastien, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph.D., membre

M. BELLENGER Jean-Philippe, Ph.D., membre

## DÉDICACE

*À mes parents qui m'ont toujours appuyée dans mon intensité*

*Et à mon cerveau droit que j'ai négligé durant ces derniers mois*

*«Le mental intuitif est un don sacré et le mental rationnel est un serviteur fidèle. Nous avons créé  
une société qui honore le serviteur et a oublié le don.»*

*Albert Einstein*

*«Ce n'est pas la destination mais la route qui compte.»*

*Proverbe gitan*

## REMERCIEMENTS

Faire un doctorat est une épreuve à la fois stimulante et pénible. J'arrive au bout de cette étape et je tiens à remercier les personnes clés qui m'ont épaulée tout le long de mes études.

Merci Louise pour ta grande disponibilité et ton écoute. J'ai toujours senti que tes étudiants sont ta priorité. Tu as su me guider avec brio dans cet univers académique pas toujours évident. Je t'en suis sincèrement très reconnaissante. Merci Sébastien pour tes conseils pertinents. Tu m'as souvent proposé des pistes de solution qui m'ont sorti de l'impasse à des moments critiques de mon parcours. Grazie mille a Giancarlo Renella per il suo sostegno durante il mio stage a Firenze e durante la redazione di mio primo manoscritto.

Merci Lucie pour ta présence, ton écoute, ton aide personnelle et professionnelle et ton intégrité. Rien n'est à ton épreuve. Je suis choyée de travailler avec toi. Merci Valérie et Réjean pour avoir vu en moi mes forces et me donner la possibilité d'explorer un autre aspect de la recherche. La vie ouvre toujours les portes aux bons moments et vous avez su me donner la motivation pour terminer mes études et passer à une autre étape.

Merci Manon Leduc, Lise Rancourt et Hélène Lalande pour votre aide professionnelle et vos précieux conseils. J'ai apprécié votre collaboration. Merci aussi à Clément Le Guillouzer qui m'a grandement aidée dans mes analyses lors d'un stage en 2011. Sans ton aide, je n'y serais pas arrivée.

Merci aux partenaires de la chaire qui ont financé mon projet de maîtrise et de doctorat. Merci aussi au Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies, qui a financé mon stage de 5 mois en Italie (programme de stages internationaux pour les étudiants de regroupement stratégique comme le CIRAIG).

Merci à mes amis scientifiques et artistes. Si vous êtes dans ma vie, c'est que j'ai vu en vous des personnes authentiques avec qui je peux être honnête et intègre. Un merci spécial à Joce avec qui j'ai fait un bout de chemin et qui a été marquant dans mon cheminement.

Merci finalement à ma famille pour votre amour inconditionnel malgré mon égo qui prend souvent de la place 😊

## RÉSUMÉ

### INTRODUCTION

L'évaluation de l'impact potentiel écotoxique des métaux en analyse de cycle de vie (ACV) repose sur des données générées lors de tests de toxicité en laboratoire et archivées dans des banques de données spécialisées en écotoxicologie. Or, peu de données sont disponibles pour les écosystèmes terrestres et celles-ci sont généralement issues de tests sur les plantes ou les invertébrés du sol, ce qui ne couvre pas assez de catégories d'organismes pour bien représenter l'écosystème. De plus, les données disponibles sont souvent inadaptées au contexte de contamination métallique et sont généralement obtenues sur des sols artificiellement contaminés en laboratoire. Par conséquent, l'impact écotoxique potentiel des métaux en ACV est mal modélisé et non représentatif des contaminations réelles. Il faut donc générer rapidement des données écotoxiques qui tiennent compte des particularités d'une contamination métallique et qui proviennent d'une autre catégorie d'organismes terrestres peu représentée en écotoxicologie. La communauté microbienne terrestre présente ainsi plusieurs atouts puisqu'elle est en contact direct avec le sol et qu'elle est indigène. De tous les indicateurs microbiens existants, l'évaluation des réponses enzymatiques du sol est une avenue intéressante puisque les enzymes sont à la base des processus métaboliques et des cycles biogéochimiques des organismes vivants, elles sont produites principalement par la communauté microbienne et elles sont sensibles aux métaux. De plus, l'agrégation des réponses de plusieurs enzymes du sol pourrait conduire à un indice de diversité fonctionnelle (DF) enzymatique, un attribut de pertinence écologique de plus en plus encouragé dans les études des services écosystémiques.

Cependant, dans le contexte d'une contamination métallique de terrain, la communauté microbienne peut développer des mécanismes de tolérance (adaptation génétique ou acclimatation physiologique) rendant l'activité enzymatique apparente des sols contaminés non corrélée au métal. Dans ce cas particulier, il faut trouver une autre approche écotoxicologique pour évaluer les réponses enzymatiques des sols contaminés par les métaux collectés sur le terrain. La stabilité enzymatique des sols, basée sur la dynamique de récupération de l'activité enzymatique suite à une perturbation contrôlée en laboratoire, est une approche de plus en plus promue en écologie microbienne et pourrait être plus sensible aux métaux que l'approche

classique basée sur l'activité enzymatique. Il faut donc étudier ces deux approches enzymatiques (activité vs stabilité) pour voir celle qui est la plus adaptée au contexte du projet. Le métal testé pour ce projet est le zinc (Zn).

L'objectif principal du projet porte sur le développement d'une méthodologie écotoxicologique basée sur la diversité fonctionnelle enzymatique agrégée et sensible à la concentration de Zn dans des sols contaminés collectés sur le terrain. Les objectifs spécifiques sont: 1) Sélectionner la solution d'incubation assurant des résultats enzymatiques justes et optimaux dans le contexte d'une contamination métallique 2) Élaborer un score de stabilité enzymatique qui tient compte des particularités physico-chimiques propres à chaque site échantillonné tout en étant sensible au Zn et 3) Générer une donnée écotoxique à partir d'un indice de diversité fonctionnelle enzymatique agrégé (activité ou stabilité) bien corrélé ( $R^2 > 0,50$ ) au Zn de sols contaminés.

#### SOLUTION D'INCUBATION DES ESSAIS ENZYMATIQUES

Le premier objectif spécifique du projet consistait à s'assurer que les essais enzymatiques génèrent des résultats représentatifs de ceux observés sur le terrain (*in situ*) et à vérifier si l'eau peut substituer l'utilisation de solutions tampon. Cette section a conduit à la rédaction du premier manuscrit intitulé “ *Metal toxicity assessment in soils using enzymatic activity : Can water be used as surrogate buffer?* ” et publié dans la revue *Soil Biology & Biochemistry* (chapitre 3). En effet, dû à l'effet ubiquitaire du pH sur l'activité enzymatique, la composition de la solution de sol et la spéciation des métaux, il fallait préliminairement s'assurer que la solution d'incubation utilisée ne modifie pas la toxicité *in situ* du Zn des sols collectés sur le terrain et qu'elle n'entraîne pas de fluctuation de pH durant les essais. Trois étapes allaient répondre à ce but : 1) Quantifier le Zn labile (une forme biodisponible) des échantillons du sol après contact avec différentes solutions d'incubation utilisées dans les essais enzymatiques (différents tampons et eau), 2) Mesurer à intervalles réguliers le pH des échantillons durant les essais enzymatiques conduits dans l'eau et 3) Comparer les essais conduits de façon standard dans un tampon à ceux conduits en parallèle dans de l'eau.

Les résultats de cet objectif sont présentés dans le chapitre 3 et la section 6.1. Ils ont montré qu'une seule solution d'incubation, le tampon acétate pH 5,8 utilisé dans les essais standards de l'arylsulfatase, augmentait considérablement la concentration du Zn labile après 2 h de contact,



temps correspondant à la durée des essais enzymatiques. Cependant, même si cette concentration est 10 à 50 fois plus élevée que celle mesurée dans l'eau ou les autres tampons, elle n'affecte pas l'activité de l'arylsulfatase à court terme (2 h) puisque l'activité de l'arylsulfatase dans le tampon acétate est très similaire à son activité dans l'eau. De plus, le pH des échantillons mis en contact avec de l'eau n'a pas significativement fluctué comparativement au pH des échantillons mis en contact avec le tampon usuel. Finalement, l'activité enzymatique obtenue en utilisant le tampon est généralement bien corrélée (c.-à-d.  $R^2$  élevé) à celle obtenue en utilisant de l'eau à l'exception de deux enzymes, l'uréase et la phosphatase alcaline, utilisant des tampons standards à pH alcalins (pH 10 et pH 11 respectivement). Par conséquent, l'utilisation de l'eau comme substitut aux tampons est justifiée, non pas parce que les tampons modifient la biodisponibilité du Zn et ainsi sa toxicité, mais plutôt parce que des conditions d'incubation standards loin des conditions réelles de terrain engendrent des résultats incertains et, qui plus est, non optimaux.

#### SCORE DE STABILITÉ ENZYMATIQUE ADAPTÉ AU CONTEXTE MÉTALLIQUE

Le deuxième objectif spécifique du projet consistait à cibler le score de stabilité enzymatique (SE) le plus sensible à une contamination réelle au Zn sur le terrain et a conduit à la rédaction du deuxième manuscrit intitulé “ *Linking Zn co-tolerance to soil enzymes resilience by a RSSI-based functional stability score* ” et soumis dans la revue *FEMS Microbiology Ecology* (chapitre 4). Une méthode SE intéressante était la méthode RSSI (*Relative Soil Stability Index*), car elle est la première à avoir considéré la dynamique de la récupération à l'intérieur de son score et elle est basée sur l'activité enzymatique du sol. Mais d'abord, il fallait modifier le score original RSSI pour y intégrer l'historique physico-chimique du site échantillonné car il s'agissait d'une lacune majeure du score original. Trois nouveaux scores ont ainsi été développés. Ici aussi, trois étapes allaient répondre à l'objectif spécifique de cette partie : 1) Normaliser le score RSSI par le sol de référence, perturbé ou non, 2) Déterminer le score SE le plus sensible au Zn en corrélant ces nouveaux scores et ceux déjà existants aux concentrations de Zn des sols et 3) Faire une analyse multivariée pour vérifier quelles propriétés physico-chimiques influencent le score SE sélectionné.

Les résultats de cette partie sont présentés dans le chapitre 4. Le meilleur score SE est un des nouveaux scores intégrant l'historique du site d'échantillonnage, soit le RSSIb. Ce score a détecté la toxicité du Zn sur trois enzymes individuelles (arylsulfatase, protéase et uréase) alors que les

autres scores n'ont détecté la toxicité du Zn que sur une enzyme (variable selon le score). Les concentrations biodisponibles de Zn (labile et soluble) ont généré les plus fortes régressions, alors que la concentration totale de Zn n'était pas bien corrélée au RSSIb. Les résultats statistiques ont montré que le score RSSIb était fortement corrélé (négativement) à la concentration de Zn labile (et de façon moindre à la concentration de Zn soluble) du sol et que la texture et le pH étaient modérément corrélés au RSSIb. Les autres propriétés (concentration de carbone organique total ou dissout, capacité tampon, capacité d'échange cationique et concentration total de Zn) ont très peu influencé la SE du sol évaluée par le score RSSIb. La SE du sol évaluée par le score RSSIb est donc un bon indicateur de toxicité du Zn des sols contaminés, car le RSSIb dépend principalement du contenu en Zn biodisponible du sol.

#### INDICE DE DIVERSITÉ FONCTIONNELLE ENZYMATIQUE

Le troisième objectif spécifique du projet consistait à développer un indice de diversité fonctionnelle enzymatique sensible au Zn et a conduit à la rédaction du troisième manuscrit intitulé “ *Toxicity response of a new enzyme-based functional diversity methodology for Zn-contaminated field-collected soils* ” et soumis dans la revue *Soil Biology & Biochemistry* (chapitre 5). Parallèlement, il fallait vérifier quelle approche, l'activité enzymatique classique ou la stabilité enzymatique évaluée par le score RSSIb agrégé, était la plus sensible au Zn et la plus judicieuse d'un point de vue pratique. Quatre étapes allaient répondre à l'objectif spécifique de cette partie : 1) Développer un indice de diversité fonctionnelle statistiquement valide basé sur l'agrégation de résultats enzymatiques (activité et stabilité) 2) Calculer les indices de DF ciblés pour chaque sol contaminé au Zn et pour chacune des deux approches enzymatiques 3) Corréler ces indices de DF aux différentes concentrations de Zn des sols afin de générer une donnée écotoxique et 4) Comparer les données et les paramètres de régression obtenus par les 2 approches enzymatiques et identifier celle qui est la plus pertinente pour évaluer la DF.

La démarche d'agrégation utilisée a été validée statistiquement par une analyse en composantes principales montrant qu'au moins 75% de la variabilité enzymatique pouvait être expliquée par la première composante principale, justifiant ainsi l'agrégation de ces 6 variables (réponses enzymatiques) en un seul indice DF. Plusieurs indices DF ont été testés, mais ce sont les moyennes pondérée et géométrique des résultats enzymatiques qui se sont avérées les plus fiables comparativement aux autres indices (Shannon, Simpson et Gini). De plus, la diversité

fonctionnelle enzymatique des sols contaminés par le Zn s'est montrée sensible à un gradient de Zn biodisponible (soluble et labile). Finalement, l'activité enzymatique agrégée demeure aussi bien corrélée à un gradient de Zn soluble ou labile que la stabilité enzymatique agrégée et ce, même après plusieurs années d'exposition. Ainsi, bien que l'utilisation du concept de stabilité enzymatique ait été judicieuse et réfléchie, elle n'a pas apporté de valeur ajoutée à l'évaluation de la toxicité du Zn par l'agrégation des résultats enzymatiques.

## CONCLUSION

Globalement, la thèse a permis de définir les bases d'une méthodologie d'évaluation de toxicité terrestre *in situ* adaptée à une contamination de Zn à long terme et basée sur la diversité fonctionnelle enzymatique, un attribut de pertinence écologique très promu. Cette méthodologie pourrait être utilisée pour d'autres contaminants métalliques de sorte à générer d'autres données écotoxiques afin d'ultimement améliorer la modélisation de l'impact potentiel toxique des métaux en ACV.

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

The potential ecotoxic impact assessment of metals in life cycle assessment (LCA) requires data generated from ecotoxicological tests and recorded in specialized databases. However, there is a lack of available terrestrial data and when available, it is mainly obtained from plants and soil invertebrates, which is insufficient to adequately represent the terrestrial ecosystem. Moreover, the available data are not adapted to a metallic contamination context and are generated from tests conducted on laboratory-spiked soils instead of field-contaminated soils. Therefore, modeling the potential toxic impact of metals raises several issues and highlights the pressing need to generate more representative data from a category of terrestrial organisms rarely used in ecotoxicology. The soil microbial community shows many advantages in this context since it is in direct and complete contact with soil and it is indigenous. Among existing microbial indicators, soil enzymatic activity is particularly interesting since enzymes are pre-requisites of metabolic pathways and biogeochemical cycles, are mainly produced by the soil microorganisms and are metal-sensitive. Furthermore, the aggregation of enzymatic responses of many soil enzymes could lead to a functional diversity (FD) index, which is an attribute of ecological relevance increasingly promoted for studying ecosystemic services.

However, in a metal field contamination context, the microbial community may develop tolerance mechanisms by genetic adaptation or physiological acclimation, yielding apparent soil enzymatic activity uncorrelated to metal concentrations. In this case, it is necessary to find an alternative approach to assess the enzymatic responses to metal contamination. The enzymatic stability, based on the resilience dynamic of the enzymatic activity after a laboratory-controlled disturbance, is an approach increasingly encouraged in microbial ecology and may be more metal sensitive than the traditional enzymatic activity approach. These two approaches need to be studied in order to establish which is the most adapted for the study of metal-contaminated field soil. Zinc was selected for this project.

The aim of this project is to develop a long-term, Zn-sensitive, ecotoxicological methodology based on the aggregated enzymatic functional diversity in field-contaminated soils. The specific objectives are to: 1) Select the incubation solution ensuring optimal and accurate enzymatic

results in a metallic contamination context; 2) Elaborate an enzymatic stability score which takes into account the physicochemical history of the sampled site and which is Zn-sensitive and; 3) Generate new ecotoxicological data from an aggregated enzymatic functional diversity (activity or stability) which is well-correlated (i.e.  $R^2 > 0.50$ ) to Zn concentrations of field-contaminated soils.

## INCUBATION SOLUTION FOR ENZYMATIC ASSAYS

The first specific objective of the project was to validate that the enzymatic assays generate representative results from those observed on the field and verify whether water could substitute the buffer in an incubation solution. This section led to the first manuscript (chapter 3), which has been accepted in the Soil Biology & Biochemistry journal. Due to the pH affecting simultaneously the enzymatic activity, the metal speciation and the soil solution composition, it was necessary to ensure that the incubation solution did not modify the *in situ* Zn toxicity of field soils and that the pH remained stable during the enzymatic assays. Three main steps were required to reach this objective: 1) Measure the labile Zn concentration of soil samples in contact with different incubation solutions used for enzymatic assays (buffers and water); 2) Measure at regular intervals sample pH of enzymatic assays conducted in water and; 3) Compare the enzymatic assays conducted in buffer to those conducted in water.

The results of this objective are recorded in chapter 3. They showed that only one incubation solution, the acetate buffer pH 5.8 used in the standard enzymatic assays related to arylsulfatase, considerably increased the labile Zn concentration after a contact time of 2 h, corresponding to the incubation time of the enzymatic assays. However, although this concentration was 10 to 50 times higher than the one measured in water or the other buffers, it did not affect the short-term response of arylsulfatase since its activity conducted in its buffer was similar to its activity conducted in water. Additionally, the pH of enzymatic samples conducted in water did not significantly fluctuate compared to the pH of those conducted in buffers. Finally, the enzymatic assays conducted in water were well-correlated (i.e.  $R^2 > 0.80$ ) to those conducted in buffers, except for two enzymes, urease and alkaline phosphatase, which both used buffers at pH 10 and pH 11 respectively. Therefore, water may be used as a surrogate incubation solution, not because the buffers modify the metal speciation and toxicity but rather because standard incubation pH,

which is far from pH observed in field soils, generates uncertain and non-optimal enzymatic results.

#### ENZYMATIC STABILITY SCORE ADAPTED TO A METALLIC CONTAMINATION

The second specific objective of this project was to select the most Zn-sensitive enzymatic stability (ES) score and led to the second manuscript (chapter 4) submitted to the FEMS Microbiology Ecology journal. One interesting ES method is known as the Relative soil stability index (RSSI) method. It was the first enzyme-based method to take into account the resilience dynamic within the ES score. The method first needed to be modified in order to include the physicochemical history of the sampled site. Thus, three new RSSI-based ES scores were created. Three main steps were required to reach this objective: 1) Normalize the RSSI score by its reference soil, disturbed or not; 2) Determine the most Zn-sensitive ES score by correlating the ES scores (new and old) to the soil Zn concentrations and; 3) Perform a multivariate analysis in order to verify which soil physicochemical properties affect the ES.

The results related to this objective are shown in chapter 4. The best ES score obtained is one of the new scores which include the physicochemical history of the sampled site, i.e. the RSSIb score. This score detected the Zn toxicity on three individual enzymes (arylsulfatase, protease and urease) whereas other ES scores detected the Zn toxicity for only one enzyme, which varied depending on the score. The labile Zn concentration generated the highest  $R^2$ , although the soluble Zn concentration was also well correlated to the RSSIb. The total Zn concentration was a poor predictor of Zn toxicity. The statistical results also showed that texture and pH were moderately correlated to the RSSIb, whereas other properties (total and dissolved organic carbon, cationic exchange capacity and buffer capacity) poorly affected the RSSIb score. The ES assessment by the RSSIb score is a suitable ecotoxicological indicator of Zn in contaminated field soil, since this score almost solely depends on the bioavailable Zn fraction of soils.

#### ENZYMATIC FUNCTIONAL DIVERSITY INDEX

The third specific objective was to develop a Zn-sensitive enzymatic functional diversity index and led to the third manuscript (chapter 5) submitted in the Soil Biology & Biochemistry journal. Alongside this objective, the most Zn-sensitive and judicious practical enzymatic approach between traditional activity or stability needed to be elucidate. Four steps were required to reach

this objective: 1) Develop a statistically valid functional diversity index based on the aggregated enzymatic results (activity and stability); 2) Calculate the selected FD indexes for every Zn-contaminated field soil and every enzymatic approach; 3) Correlate these FD indexes with the Zn concentrations in order to generate ecotoxicological data and; 4) Compare the regression parameters and identify the most relevant enzymatic approach.

The enzymatic aggregation was statistically validated by a principal component analysis showing that at least 75% of the enzymatic variability could be explained by the main component, which justified the aggregation of the 6 variables (enzymatic responses) in one FD index. Many FD indexes were tested, but the weighted and geometric means better assessed the Zn toxicity than other indexes such as the Shannon, Simpson or Gini index. The enzymatic FD indexes based on means were similarly sensitive to soluble and labile Zn concentrations, but not to the total Zn concentration. Moreover, the traditional enzymatic activity approach remained as Zn-sensitive as the enzymatic stability approach even after many years of metal exposition. This entails that, although the idea of using the ES approach was thoughtful and judicious, this approach did not provide any added value for the Zn toxicity assessment by aggregated enzymatic results.

## CONCLUSION

Globally, this thesis defines the basis of a new *in situ* methodology for the long-term terrestrial ecotoxicity of Zn, based on the enzymatic functional diversity, an increasingly promoted attribute of ecological relevance. This methodology could be used for other metals in order to generate more ecotoxicological data and ultimately improve the potential ecotoxic impact modeling of metals in LCA.

## TABLE DES MATIÈRES

Dédicace .....	iii
Remerciements .....	v
Résumé .....	vi
Abstract .....	xi
Table des matières .....	xv
Liste des tableaux .....	xxi
Liste des figures .....	xxiii
Liste des sigles et abréviations .....	xxv
Liste des annexes .....	xxix
Introduction .....	1
CHAPITRE 1. Revue critique .....	3
1.1. Contexte du projet pour l'analyse du cycle de vie .....	3
1.1.1. L'analyse du cycle de vie .....	3
1.1.2. L'évaluation des impacts du cycle de vie des métaux .....	4
1.1.3. Le facteur effet des métaux en ÉICV .....	6
1.1.4. Lacunes de la modélisation du facteur effet .....	8
1.2. Le sort du Zn dans les sols .....	10
1.2.1. Le Zn .....	10
1.2.2. Importance économique et sociale du Zn .....	11
1.2.3. Contamination anthropique du Zn .....	12
1.2.4. Persistance et vieillissement d'une contamination métallique .....	13
1.2.5. Spéciation des métaux .....	13
1.2.6. Relation entre spéciation, biodisponibilité, essentialité et toxicité .....	15



1.3.	L'écotoxicité terrestre du Zn .....	17
1.3.1.	Le sol : santé et fonctions .....	17
1.3.2.	Effet du Zn sur les différentes catégories d'organismes terrestres.....	17
1.3.3.	Effet du Zn sur la communauté microbienne du sol .....	18
1.4.	Effet du Zn sur les enzymes du sol .....	22
1.4.1.	Compartimentation des enzymes .....	22
1.4.2.	Les essais enzymatiques.....	22
1.4.3.	Effet du Zn sur l'activité enzymatique .....	23
1.4.4.	Limites des essais enzymatiques .....	24
1.4.5.	Influence des conditions expérimentales lors des essais enzymatiques .....	25
1.5.	Tolérance et stabilité fonctionnelle des microorganismes du sol exposés aux métaux ..	26
1.5.1.	La tolérance .....	26
1.5.2.	La stabilité fonctionnelle .....	27
CHAPITRE 2.	Problématique, hypothèse de recherche et objectifs .....	32
2.1.	Problématique.....	32
2.2.	Hypothèse de recherche .....	33
2.3.	Objectifs de recherche.....	33
	Principal .....	33
	Spécifiques .....	33
2.4.	Méthodologie générale.....	34
CHAPITRE 3.	Premier manuscrit: Metal toxicity assessment in soils using enzymatic activity: can water be used as a surrogate buffer? .....	36
3.1.	Présentation du premier manuscrit.....	36
3.2.	Abstract .....	37

3.3.	Introduction .....	37
3.4.	Material and Methods.....	40
3.4.1.	Soil sampling and physicochemical characterization.....	40
3.4.2.	Labile Zn concentration based on the solvent .....	41
3.4.3.	Enzymatic assays and pH monitoring .....	41
3.4.4.	Statistical analysis .....	43
3.5.	Results .....	44
3.5.1.	Physicochemical properties of field-collected soils .....	44
3.5.2.	Labile Zn concentration based on solvent.....	46
3.5.3.	pH monitoring during enzymatic assays in H <sub>2</sub> O .....	48
3.5.4.	Enzymatic assays conducted in buffers compared to H <sub>2</sub> O.....	48
3.6.	Discussion .....	49
3.6.1.	Labile Zn concentration based on solvent.....	49
3.6.2.	pH fluctuation during enzymatic assays in H <sub>2</sub> O .....	50
3.6.3.	Enzymatic assays conducted in buffers compared to H <sub>2</sub> O.....	51
3.7.	Conclusion.....	52
CHAPITRE 4.	Deuxième manuscrit: Enzymatic functional stability of Zn-contaminated field-collected soils: an ecotoxicological perspective.....	53
4.1.	Lien entre le premier manuscrit et les manuscrits subséquents .....	53
4.2.	Présentation du deuxième manuscrit.....	53
4.3.	Abstract .....	54
4.4.	Introduction .....	54
4.5.	Materials and methods .....	57
4.5.1.	Soil sampling and physicochemical characterization.....	57

4.6.	RSSI method and FS scores calculation.....	58
4.6.1.	Overview of the time-integrated RSSI method .....	58
4.6.2.	FS scores calculation .....	59
4.6.3.	Bivariate regressions of FS scores against Zn concentration .....	62
4.6.4.	Relationships among RSSI scores and physicochemical properties .....	64
4.7.	Results .....	64
4.7.1.	Physicochemical characterization .....	64
4.7.2.	Bivariate regressions of FS scores against Zn concentration .....	66
4.7.3.	Relationships among RSSI scores and physicochemical properties .....	68
4.8.	Discussion .....	70
4.8.1.	Bivariate regressions of FS scores against Zn concentration .....	70
4.8.2.	Fit model comparison.....	72
4.8.3.	RSSI score-physicochemical property relationships.....	73
4.8.4.	Limitations and perspectives of the RSSI-based method.....	73
4.9.	Supporting information .....	75
CHAPITRE 5.	Troisième manuscrit: Toxicity response of a new enzyme-based functional diversity methodology for Zn-contaminated field-collected soils .....	77
5.1.	Lien entre le deuxième et le troisième manuscrit.....	77
5.2.	Présentation du troisième manuscrit .....	77
5.3.	Abstract .....	78
5.4.	Introduction .....	79
5.5.	Materials and methods .....	81
5.5.1.	Soil sampling and physicochemical analyses.....	81
5.5.2.	Assessment of enzymatic approaches .....	82

5.5.3.	Aggregation of enzymatic responses.....	84
5.5.4.	Concentration-response curves from aggregated enzyme FD indexes .....	86
5.6.	Results .....	86
5.6.1.	Soil physicochemical and enzymatic characterization.....	86
5.6.2.	Aggregation of enzymatic responses.....	89
5.6.3.	Concentration-response curves from aggregated enzyme indexes .....	92
5.7.	Discussion .....	94
5.7.1.	Enzymatic data fitting to obtain the EC <sub>50</sub> .....	94
5.7.2.	Comparison of the EC <sub>50</sub> with the literature .....	95
5.7.3.	Choice of soil enzymes in the FD index .....	99
5.8.	Conclusion.....	99
5.9.	Supporting information .....	101
CHAPITRE 6.	Résultats supplémentaires .....	107
6.1.	Comparaison de l'activité enzymatique tampon vs eau pour de nouvelles enzymes...107	
6.2.	Démarche comparative pour évaluer la santé d'un sol par stabilité fonctionnelle.....108	
6.3.	Influence des propriétés physico-chimiques sur les indices DF .....	110
CHAPITRE 7.	Discussion générale .....	114
7.1.	Forces .....	114
7.2.	Limites.....	115
7.3.	Perspectives et recommandations.....	116
7.3.1.	Validation et optimisation .....	117
7.3.2.	Ouverture et futurs axes de recherche .....	119
Conclusion.....		120
7.4.	Contribution scientifique.....	120

7.5. Contribution pratique .....	121
Bibliographie .....	123
Annexes .....	151

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.2-1: Quelques propriétés du Zn (IZA, 2011).....	11
Tableau 1.5-1: Description des scores de stabilité fonctionnelle disponibles.....	31
Table 3.5-1: Physicochemical properties of Zn-contaminated field soils used to study the effect of buffers on metal speciation .....	45
Table 3.5-2: Labile zinc concentration (mg Zn kg <sup>-1</sup> dry soil) measured in ten Zn-contaminated soils submitted to a 2-hr contact time with different solvents (mean ± standard deviation, triplicate). .....	46
Table 3.5-3: Variation of pH values for enzyme assays conducted in water. ....	48
Table 3.5-4: Statistical summary of linear regressions of enzymatic assays conducted in buffers (EA <sub>B</sub> <sup>a</sup> ) related to enzymatic assays conducted in water (EA <sub>W</sub> <sup>b</sup> ) for each enzyme.....	49
Table 4.6-1: Description of functional stability scores used in this study .....	60
Table 4.6-2: Mathematical models tested on bivariate regressions of FS scores against Zn concentration (total, total soluble or labile) .....	63
Table 4.7-1: Main statistical information related to the physicochemical properties of Zn-contaminated field soils (see Table 4.9-1 for details) .....	65
Table 4.7-2: Coefficient of regression R <sup>2</sup> , EC <sub>50</sub> (expressed as µg labile Zn·L <sup>-1</sup> of dry soil) and rank of best-fit model based on AICC obtained from the regressions constructed using different FS scores related to contaminated soil as y-axis and the labile Zn concentration as x-axis (n=16). .....	67
Table 4.9-1: Physicochemical properties of 20 pairs of field-collected soils .....	75
Table 5.5-1: Calculated enzyme-based functional diversity indexes .....	85

Table 5.6-1: Main statistical information related to enzymatic activities and Zn fractions of the 10 pairs of Zn-contaminated field soils.....	88
Table 5.6-2: Eigenvectors $v$ and weights $w$ of each enzyme $i$ associated with the first principal component for both enzymatic approaches .....	90
Table 5.6-3: Enzymatic aggregated indexes calculated per soil by the EA and ES approaches....	91
Table 5.6-4: Concentration-response parameters ( $R^2$ and $EC_{50}$ ) recorded by enzymatic approach and by type of mean aggregated index based on every enzyme or only enzymes with higher weight $w_i$ .....	93
Table 5.7-1: $EC_{50}$ data related to Zn toxicity in various soil organisms.. .....	98
Tableau 6.1-1 : Régressions linéaires liant l'activité enzymatique conduite dans le tampon à celle conduite dans l'eau pour chaque enzyme .....	107
Tableau 6.2-1 : Score de SF relatif au sol contaminé comparé à celui du sol de référence pour chaque paire de sols.....	109
Tableau 6.3-1 : Coefficients de corrélation $r$ de Pearson avec les moyennes DF enzymatiques et les propriétés physico-chimiques des sols.....	112

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1-1: Exemple de courbe dose-réponse. Adaptée de (Walker et al., 2006).....	7
Figure 1.2-1: Zone d'essentialité et toxicité des métaux.....	16
Figure 1.5-1 : A) Schématisation de l'effet temporel de la perturbation sur l'AE.....	29
Figure 2.4-1 : Les trois principaux blocs méthodologiques derrière le projet de doctorat.. .....	34
Figure 2.4-2 : Les étapes méthodologiques impliquées derrière chaque objectif spécifique du projet de doctorat.....	35
Figure 3.5-1 : Tukey-HSD mean separation test results of the Zn labile concentrations (mg Zn kg <sup>-1</sup> dry soil) measured in ten Zn-contaminated soils submitted to a 2-hr contact time with four different solvents. ....	47
Figure 3.5-2 : Tukey-HSD mean separation test results of the labile Zn concentration (mg Zn kg <sup>-1</sup> dry soil) measured in ten Zn-contaminated soils submitted to a 2-hr contact time with different solvents without the acetate buffer (same data as in Figure 1 without acetate buffer for more clarity). ....	47
Figure 4.6-1 : Schematic examples of the RSSI method and the calculation of the five RSSI scores described in section 4.6.2 (Adapted from Bécaert <i>et al.</i> (2006)). ....	61
Figure 4.7-1 : Bi-dimensional graph of the two main PCs illustrating the RSSI-b vectors of the four enzymes and the physicochemical vectors .....	69
Figure 5.5-1 : Schematic example of the calculation of the RSSI-b score from areas under EA curves over time.. .....	83
Figure 5.6-1 : Scree plot illustrating the distribution of the variance over the principal components (PC).....	89
Figure 5.9-1 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$ and $EC_{50}$ ) from weighted and geometric means aggregated enzyme indexes using labile Zn concentration.....	101



Figure 5.9-2 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$ and $EC_{50}$ ) from weighted and geometric means aggregated enzyme indexes using soluble Zn concentration .....	102
Figure 5.9-3 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$ and $EC_{50}$ ) from weighted and geometric means aggregated enzyme indexes using total Zn concentration.....	103
Figure 5.9-4 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$ and $EC_{50}$ ) from conventional diversity indexes using labile Zn concentration (n=9, St-Jean soil excluded). .....	104
Figure 5.9-5 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$ and $EC_{50}$ ) from conventional diversity indexes using soluble Zn concentration (n=9, St-Jean soil excluded).....	105
Figure 5.9-6 : Concentration-response regressions from conventional diversity indexes using total Zn concentration.....	106
Figure 6.3-1 : Graphique bidimensionnel des deux composantes principales illustrant les vecteurs des indices DF associés aux deux approches enzymatiques et les propriétés physico-chimiques des sols .....	111

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

*En italique : sigle ou abréviation en anglais*

<i>ACF</i>	<i>Accessibility Factor</i>
ACP	Analyse en Composantes Principales
ACV	Analyse du Cycle de Vie
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AE	Activité Enzymatique
<i>AICC</i>	<i>Akaike Information Criterion Coefficient</i>
<i>AMI</i>	<i>Assessment of Mean Impact</i>
<i>ANCOVA</i>	<i>ANalysis of COVariance</i>
<i>ANOVA</i>	<i>ANalysis of VAriance</i>
ARN	Acide RiboNucléique
<i>ASV</i>	<i>Anodic Stripping Voltametry</i>
ATP	Adénosine TriPhosphaste
<i>BF</i>	<i>Bioavailability Factor</i>
<i>BC</i>	<i>Buffer Capacity</i>
<i>BLM</i>	<i>Biotic Ligand Model</i>
CEC	Capacité d'Échange Cationique ( <i>Cationic Exchange Capacity</i> )
<i>CF</i>	<i>Characterization Factor</i>
<i>CLPP</i>	<i>Community Level Physiological Profile</i>

COD	Carbone Organique Dissous
COT	Carbone Organique Total
DF	Diversité fonctionnelle
<i>DGGE</i>	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
<i>DGT</i>	<i>Diffusive Gradient in Thin film</i>
<i>DMT</i>	<i>Donnan Membrane Technique</i>
<i>DOC</i>	<i>Dissolved Organic Carbon</i>
<i>EA</i>	<i>Enzymatic Activity</i>
<i>EC<sub>x</sub></i>	<i>Effect Concentration</i> : concentration affectant x% de la population d'une espèce
<i>EF</i>	<i>Effect Factor</i>
ÉICV	Évaluation des Impacts du Cycle de Vie
<i>ES</i>	<i>Enzymatic Stability</i>
<i>FD</i>	<i>Functional Diversity</i>
<i>FF</i>	<i>Fate Factor</i>
<i>FIAM</i>	<i>Free Ion Activity Model</i>
<i>FS</i>	<i>Functional Stability</i>
<i>HC50<sub>x</sub></i>	<i>Hazardous Concentration</i> : moyenne géométrique des paramètres x
<i>HSD</i>	<i>Honestly Significant Difference</i>
<i>ICP-MS</i>	<i>Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry</i>

ICV	Inventaire du Cycle de Vie
<i>ISO</i>	<i>International Organization for Standardization</i>
$K_d$	Coefficient de partition sol-eau
<i>LC</i>	<i>Laboratory-Controlled (disturbance)</i>
$LC_x$	<i>Letal Concentration</i> : concentration tuant x% de la population d'une espèce
<i>LOEC</i>	<i>Low Effect COncentration</i>
$M_i$	Masse totale de la substance i émise
MDDEP	Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs
MOT	Matière Organique Totale
MOD	Matière Organique Dissoute
<i>MUB</i>	<i>Modified Universal Buffer</i>
<i>NOEC</i>	<i>No Effect Concentration</i>
<i>OECD</i>	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
<i>PAF</i>	<i>Potentially Affected Fraction</i>
<i>PC</i>	<i>Principal Component</i>
<i>PCA</i>	<i>Principal Component Analysis</i>
<i>PICT</i>	<i>Pollution Induced Community Tolerance</i>
<i>RSSI</i>	<i>Relative Soil Stability Index</i>
SE	Stabilité Enzymatique

SF	Stabilité Fonctionnelle
<i>SETAC</i>	<i>Society for Environmental Toxicity And Chemistry</i>
S <sub>i</sub>	Score d'impact potential
<i>SOP</i>	<i>Standard Operationnal Protocol</i>
<i>SSD</i>	<i>Species Sensitivity Distribution</i>
<i>SW-ASV</i>	<i>Square Wave – Anodic Stripping Voltammetry</i>
<i>TBLM</i>	<i>Terrestrial Biotic Ligand Model</i>
<i>TOC</i>	<i>Total Organic Carbon</i>
TRIS	TRIS-hydroxymethyl-aminomethane
<i>UNEP</i>	<i>United Nation of Environment Program</i>

## LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Échantillonnage de sols près de structures faites d'acier galvanisé dans le cadre du projet de contamination de sols au zinc pour des fins d'analyses physico-chimiques et écotoxiques.....	151
Annexe 2: Mesure de l'activité de l'uréase dans un sol.....	162
Annexe 3: Mesure de l'activité de la protéase dans les sols .....	168
Annexe 4: Mesure de l'activité de l'arylsulfatase dans les sols.....	175
Annexe 5: Mesure de l'activité de la phosphatase dans les sols .....	181
Annexe 6: Mesure de la fraction labile de zinc dans le tampon et dans l'eau après incubation ..	188
Annexe 7: Extraction d'une solution de sol pour analyse du zinc total en solution et du zinc labile .....	196
Annexe 8: Extraction de la matière organique dissoute (DOC) dans des sols par une solution saline fortement ionique .....	202
Annexe 9: Suivi du pH et de la concentration d'ammonium à court terme (4h) pour l'uréase contenue dans un sol .....	207
Annexe 10: Mesure de l'activité de l'invertase dans un sol.....	212
Annexe 11 : Mesure de l'activité de l'invertase dans un sol pour suivi du pH dans l'eau .....	219
Annexe 12: Digestion acide à l'eau régale pour quantifier la concentration totale de métaux dans un échantillon de sol.....	224

## INTRODUCTION

L'écotoxicologie constitue un domaine de recherche générant des données écotoxiques utilisées comme valeurs de référence pour évaluer l'impact potentiel toxique d'un contaminant sur une espèce, une population ou une communauté (Walker et al., 2006). L'évaluation de la toxicité des contaminants sur les organismes terrestres a pris beaucoup de retard comparativement à celle sur les organismes aquatiques et est basée presque uniquement sur deux niveaux trophiques, les plantes et les invertébrés du sol, ce qui est insuffisant pour bien représenter les interactions complexes de l'écosystème (Haye et al., 2007). Par conséquent, l'analyse du cycle de vie (ACV), un domaine de recherche appliquée qui requiert ces valeurs de référence, stagne car il n'y a pas assez de données disponibles pour bien modéliser l'écotoxicité terrestre (Hauschild et al., 2008). De plus, pour la catégorie particulière de contaminants que constituent les métaux, la modélisation actuelle est biaisée car les modèles n'ont pas su intégrer adéquatement les spécificités des métaux, comme la persistance, la spéciation et le vieillissement, bien qu'un effort collectif est en cours pour résoudre le problème (Gandhi et al., 2010; Owsianiak et al., 2013). Quoiqu'il en soit, tant qu'il n'y aura pas de nouvelles données terrestres produites et adaptées au contexte d'une contamination métallique, les modèles écotoxicologiques terrestres, bien qu'optimisés, ne pourront pas être utilisés.

La communauté microbienne indigène du sol sécrète de nombreuses enzymes couvrant les différents cycles biogéochimiques. Étudier la toxicité du métal en agrégeant les réponses de plusieurs enzymes du sol pourrait être une alternative originale et pertinente qui permettrait de générer de nouvelles données de diversité fonctionnelle basées sur un niveau trophique terrestre sous-représenté. Cependant, il est possible que la communauté microbienne du sol soit devenue tolérante à long-terme au métal et que l'activité enzymatique devienne après un certain temps moins sensible au métal. Dans ce cas, il faudrait trouver une approche différente d'évaluation de l'impact toxique des métaux dans les sols. L'écotoxicologie est justement à un point tournant où la toxicité des contaminants n'est plus simplement évaluée par des indicateurs biologiques conventionnels tel que la biomasse microbienne ou l'activité individuelle d'une enzyme mais plutôt par des attributs de pertinence écologique ou des services écosystémiques comme la stabilité et la diversité fonctionnelle (Garbisu et al., 2011).

Le but principal de cette thèse était donc de développer une méthodologie d'évaluation de toxicité terrestre à long-terme du Zn et basée sur la diversité fonctionnelle enzymatique des sols. Pour y parvenir, il faut répondre à trois objectifs spécifiques: 1) Sélectionner la solution d'incubation pour laquelle sa composition chimique ne modifie pas la toxicité du Zn dans les sols tout en assurant un pH stable pendant les essais enzymatiques, 2) Élaborer un score de stabilité fonctionnelle basé sur les enzymes du sol qui tienne compte des particularités physico-chimiques propres à chaque site échantillonné tout en étant sensible à un gradient de Zn biodisponible et 3) Vérifier si un indice de diversité fonctionnelle enzymatique est un bon indicateur écotoxicologique ( $R^2 > 0,50$ ) de la toxicité à long-terme du Zn.

Le chapitre 1 présente la revue critique de la littérature conduisant à la problématique abordée plus haut. Cette revue de littérature amène progressivement le lecteur vers l'hypothèse, les objectifs et la méthodologie générale de recherche décrits dans le chapitre 2. Le chapitre 3 présente le premier manuscrit lié au premier objectif spécifique traitant d'une problématique expérimentale qu'il fallait résoudre avant d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats. Le chapitre 4 montre la pertinence d'utiliser la stabilité enzymatique comme indicateur de toxicité terrestre dans le contexte d'une contamination métallique, ce qui a fait l'objet du deuxième manuscrit lié au deuxième objectif spécifique. Le chapitre 5 présente le troisième manuscrit lié au troisième objectif spécifique exposant un nouvel indice de diversité fonctionnelle adapté à une contamination métallique. Le chapitre 6 détaille quelques résultats supplémentaires non publiés qui appuient la discussion générale. Le chapitre 7 lie les trois manuscrits en une discussion cohérente et générale portant sur l'objectif principal de cette thèse et énonce les perspectives et recommandations issues de ces travaux de doctorat. Finalement, la conclusion met en évidence les contributions scientifique et pratique de l'ensemble des travaux de la thèse.



## CHAPITRE 1. REVUE CRITIQUE

La revue de littérature se divise en cinq sections principales qui s'approcheront tour à tour de l'hypothèse et des objectifs de recherche : 1) le contexte du projet en ACV 2) le sort du Zn dans le sol, 3) l'écotoxicité terrestre du Zn, 4) l'effet du Zn sur les enzymes du sol et 5) la tolérance et stabilité fonctionnelle des microorganismes du sol exposés aux métaux. Ces sections sont essentielles pour comprendre les problématiques qui mènent aux objectifs du projet de doctorat.

### 1.1. Contexte du projet pour l'analyse du cycle de vie

#### 1.1.1. L'analyse du cycle de vie

L'ACV est un outil de management environnemental encadré par la norme ISO 14040<sup>1</sup> et par le *Life Cycle Initiative* de la UNEP-SETAC, un partenariat entre le programme environnemental des nations unies (UNEP, *United Nation Environment Program*) et la SETAC (*Society for Environmental Toxicology and Chemistry*) visant le développement et la mise en oeuvre à l'échelle internationale de la pensée cycle de vie (Jolliet et al., 2004). La pensée cycle de vie d'un produit (ou procédé ou service), c'est se demander quelle est l'amplitude des impacts potentiels environnementaux d'un produit comparativement à un autre accomplissant la même fonction. L'ACV fonctionne selon la pensée cycle de vie en ciblant les points chauds de l'ensemble du cycle de vie d'un produit, c'est-à-dire de l'extraction des matières premières, de la fabrication, du transport impliqué pour desservir le produit, de son utilisation et de sa fin de vie.

La réalisation d'une ACV repose sur quatre étapes principales: 1) la définition des objectifs et du système, 2) l'inventaire des émissions et des extractions, 3) l'évaluation des impacts du cycle de vie et 4) l'interprétation des résultats (Jolliet et al., 2005). La définition des objectifs et du système consiste à poser les limites du système et à définir la portée de l'étude, à établir la fonction commune aux produits comparés et à cibler les acteurs impliqués. L'inventaire des émissions et extractions (ICV) consiste à détailler à l'aide de bilans massiques et énergétiques les flux de matière et d'énergie qui traversent les limites du système afin de répondre aux fonctions préalablement définies pour tout le cycle de vie du produit. L'évaluation des impacts du cycle de vie (ÉICV) consiste à transformer les émissions comptabilisées de l'ICV en impacts

---

<sup>1</sup> [http://www.iso.org/iso/fr/catalogue\\_detail.htm?csnumber=23151](http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail.htm?csnumber=23151)

environnementaux potentiels. Plusieurs impacts potentiels sont calculés : les changements climatiques, la toxicité d'une substance sur l'humain et l'écosystème, l'utilisation des ressources comme les métaux, les terres et l'eau, etc. La dernière étape d'une ACV consiste à interpréter les résultats de l'ÉICV, à identifier les priorités d'action et à analyser la sensibilité des données et hypothèses posées lors des étapes précédentes de l'analyse (Jolliet et al., 2005).

### 1.1.2. L'évaluation des impacts du cycle de vie des métaux

Ce projet de doctorat vise l'amélioration de l'étape ÉICV et plus spécifiquement de la modélisation de l'effet toxique des métaux dans les sols. Pour bien comprendre les lacunes de la modélisation actuelle, il faut d'abord expliquer quelques concepts de base en ÉICV.

Au cours des dix dernières années de recherche en ÉICV, plusieurs méthodes ÉICV adaptées à différentes régions ont été élaborées : CML (Guinée et al., 2002), Impact 2002 (Jolliet et al., 2003), Eco-indicator 99 (Goedkoop & Spriensma, 1999), etc. Ces méthodes évaluent généralement les différentes catégories d'impacts globaux comme les changements climatiques sous une méthodologie similaire mais évaluent les différentes catégories d'impacts locaux comme la toxicité humaine ou l'écotoxicité de façon très différente (Larsen & Hauschild, 2007). Face à cette hétérogénéité, plusieurs chercheurs en ÉICV et en écotoxicité ont collaboré à l'élaboration d'un modèle consensuel appelé USEtox (en l'honneur au partenariat entre UNEP et SETAC) pour uniformiser et améliorer les facteurs de caractérisation relatifs à la toxicité humaine et l'écotoxicité (Hauschild et al., 2008). Les développeurs des méthodes CML, Impact 2002 et Eco-indicator 99 figuraient parmi les acteurs de la création de USEtox (Rosenbaum et al., 2008).

Dans le modèle USEtox, l'impact potentiel d'une substance  $i$  ( $S_i$ ) se calcule en multipliant un facteur de caractérisation ( $CF$ , *characterization factor*) spécifique à la catégorie d'impact par la masse totale de la substance émise ( $M$ ).

Équation 1 :

$$S_i^{mn} = CF_i \times M_i^m$$

où  $m$  est le compartiment de l'émission et  $n$  est le compartiment final (Hauschild & Pennington, 2002). Il est ensuite possible d'additionner le score d'impact potentiel individuel de chaque

substance pour obtenir un score d'impact potentiel total représentant une catégorie d'impact potentiel.

Le facteur de caractérisation permet de lier les données d'inventaire des émissions à un impact environnemental potentiel. Le CF de l'impact écotoxique aquatique d'une substance se calcule actuellement en multipliant un facteur sort (*FF*, *Fate Factor*) et un facteur effet (*EF*, *Effect factor*). L'exposition est prise en compte dans le facteur effet (Hauschild & Pennington, 2002). Il y a quelques années, un modèle de calcul du CF en écotoxicité aquatique a été proposé (Diamond, 2009; Gandhi et al., 2010). La modification majeure du modèle initial repose sur l'ajout d'un facteur de biodisponibilité (*BF*, *Bioavailability Factor*) dans le calcul du CF de l'impact écotoxique aquatique:

Équation 2 :

$$CF = FF \times BF \times EF = \frac{\Delta C_{total} \cdot V}{\Delta m_{total}} \times \frac{\Delta C_{bio}}{\Delta C_{total}} \times \frac{\Delta PAF}{\Delta C_{bio}} \left[ \frac{PAF \cdot m^3 \cdot jour}{kg} \right]$$

où  $\Delta C_{total}$  est la concentration totale du métal transférée dans l'eau ( $kg/m^3$ ),  $\Delta C_{bio}$  est la concentration biodisponible du métal dans l'eau ( $kg/m^3$ ),  $V$  est le volume ( $m^3$ ),  $\Delta m$  est le débit massique ( $kg/j$ ) de l'émission dans le compartiment initial,  $PAF$  est la fraction d'espèces potentiellement affectées et le signe  $\Delta$  signifie un changement incrémentiel de ces mesures.

Récemment, un nouveau modèle adapté au contexte terrestre a été proposé spécifiquement pour tenir compte des particularités des métaux émis dans les sols (Owsianiak et al., 2013).

Équation 3 :

$$CF = FF \times ACF \times BF \times EF = \frac{\Delta C_{total} \cdot V \cdot \rho}{\Delta m_{total}} \times \frac{\Delta C_{réactif}}{\Delta C_{total}} \times \frac{\Delta C_{libre} \cdot \theta}{\Delta C_{réactif} \cdot \rho} \times \frac{\Delta PAF}{\Delta C_{libre}} \left[ \frac{PAF \cdot m^3 \cdot jour}{kg} \right]$$

où  $\rho$  est la densité du sol ( $kg/m^3$ ),  $\theta$  est le contenu volumétrique sol-eau ( $m^3/m^3$ ), *FF* (*fate factor*) est un facteur considérant le sort physico-chimique du métal dans un sol, *ACF* (*accessibility factor*) est un facteur d'accessibilité qui tient compte du rôle de la fraction réactive du métal dans

un sol, BF (*bioavailability factor*) est un facteur de biodisponibilité du métal qui convertit la fraction réactive du métal en fraction ionique libre et EF (*effect factor*) est le facteur d'effet calculant la fraction d'espèces potentiellement affectées par le métal par cette fraction ionique libre du métal.

Ainsi, l'ajout explicite d'un facteur de biodisponibilité et d'un facteur d'accessibilité renvoie à l'utilisateur l'importance d'intégrer des notions de spéciation et de physico-chimie lorsque l'écotoxicité terrestre des métaux ou autres molécules polaires est traitée. D'autres travaux au sein même du CIRAIG sont en cours pour améliorer la justesse du facteur de caractérisation pour les écosystèmes terrestres.

### 1.1.3. Le facteur effet des métaux en ÉICV

Le projet de doctorat se concentre autour du facteur effet de l'écotoxicité terrestre en ÉICV. Le facteur effet EF utilise des données générées par des tests écotoxicologiques. Il faut ici introduire quelques notions d'écotoxicologie avant d'aller plus loin.

Une substance exogène émise dans un système peut altérer certaines fonctions biologiques des organismes en contact direct ou indirect avec ce système. On parle alors de contaminants. La perte de fonction(s) biologiques d'un organisme ou d'une communauté d'organisme devient alors un indicateur de toxicité. Les tests de toxicité corréleront une quantité (dose) ou une concentration à un effet biologique observé, comme la mort ou toute autre altération d'une fonction biologique (croissance, germination, génotoxicité, diversité, activité, etc.). La relation causale engendrée par cette régression est souvent illustrée par une courbe dose-réponse ou concentration-réponse d'où sont extraits les indicateurs de toxicité appelés données ou paramètres écotoxiques. Par exemple, la NOEC (*No Effect Concentration*) est la concentration maximale mesurée d'une substance qui n'engendre pas d'effet sur l'espèce, la LOEC (*Low Effect Concentration*) est la concentration minimale mesurée à laquelle un effet est observé et la  $EC_x/LC_x$  (*x% Effect/Lethal Concentration*) est la concentration d'une substance qui affecte x% de la population d'une espèce (Walker et al., 2006). Ces paramètres écotoxiques sont diffusés à la communauté scientifique dans des publications ou des banques de données spécialisées (par exemple, ECOTOX<sup>2</sup> de l'Agence de

---

<sup>2</sup> <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>

Protection Environnementale des États-Unis US-EPA ou la banque de données de l'Institut Nationale de l'Environnement industriel et des risques, l'INERIS<sup>3</sup>).

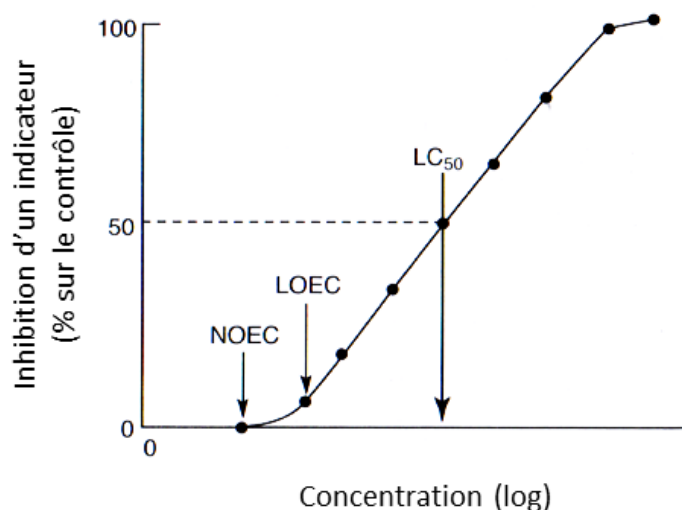


Figure 1.1-1: Exemple de courbe dose-réponse. Adaptée de (Walker et al., 2006)

Dans le modèle USEtox, deux méthodes calculant le facteur effet ont été sélectionnées : Combi-PAF (va de Meent & Huijbregts, 2005) et AMI (*Assessment of Mean Impact*) (Payet, 2004). La méthode Combi-PAF repose sur des courbes SSD (*Species Sensitivity Distribution*) représentant une distribution statistique cumulative de NOEC chroniques par rapport à la concentration (log) d'une substance (Posthuma et al., 2002). La méthode AMI détermine son facteur effet à partir de la moyenne géométrique des EC<sub>50</sub> chroniques (HC<sub>50</sub><sub>EC<sub>50</sub></sub>) provenant d'au moins trois phyla différents. Cette méthode a défini des facteurs d'extrapolation pour convertir des paramètres aigus en paramètres chroniques et des NOEC en EC<sub>50</sub> lorsqu'il n'y a pas suffisamment de EC<sub>50</sub> chroniques disponibles pour achever la modélisation, ce qui permet de modéliser un grand nombre de substances. Contrairement à la méthode Combi-PAF, ce modèle ne requiert pas de courbe SSD (Payet, 2004).

Les deux méthodes ont été retenues dans USEtox (Rosenbaum et al., 2008). Cependant, la méthode AMI serait plus robuste que la méthode Combi-PAF car elle repose sur des EC<sub>50</sub> au lieu des NOEC (Jolliet et al., 2006). En effet, le paramètre EC<sub>50</sub> est extrapolé d'une courbe dose-réponse à 50% de l'effet, alors que la NOEC est la concentration maximale mesurée avant

<sup>3</sup> <http://www.ineris.fr/>

d'observer un effet sur cette même courbe dose-réponse. La NOEC dépend donc fortement du design expérimental des différentes concentrations testées et peut engendrer une erreur substantielle si la NOEC et la LOEC sont trop espacées dans le design expérimental du test écotoxique (Payet, 2004). Il n'y a pas encore de consensus à savoir si le calcul du facteur effet doit couvrir différents niveaux trophiques (par exemple trois au minimum, tel que proposé dans la méthode AMI) ou s'il doit tenir compte de tous les paramètres écotoxiques disponibles sans égard aux niveaux trophiques impliqués (Rosenbaum et al., 2008).

Le facteur effet EF des équations 2 et 3 calculé par la méthode AMI est:

Équation 4 :

$$EF = \frac{0,5}{HC50_{EC50}}$$

où la  $HC50_{EC50}$  est la moyenne géométrique des  $EC_{50}$ .

#### 1.1.4. Lacunes de la modélisation du facteur effet

Le calcul du facteur effet renferme plusieurs lacunes. Les approches proposées par Gandhi et al. (2010) et Owsianiak et al. (2013) constituent une avancée majeure en ÉICV. La communauté scientifique oeuvrant dans le développement de l'ACV fait des efforts considérables depuis une décennie pour inclure la notion de biodisponibilité dans l'évaluation de l'effet toxique des métaux. Néanmoins, quelques lacunes importantes et indépendantes de la modélisation ÉICV persistent. La principale repose sur le manque de données écotoxiques terrestres disponibles. Une faible proportion (1 à 5%) de toutes les données disponibles est issue de tests écotoxiques réalisés sur des sols alors qu'une forte majorité des données appartiennent aux écosystèmes aquatiques (Haye et al., 2007). En effet, la recherche en écotoxicité terrestre est beaucoup moins avancée que celle caractérisant les écosystèmes aquatiques car la matrice triphasique du sol (solide-liquide-gazeuse) est beaucoup plus complexe à étudier que la matrice diphasique eau (liquide-gazeuse), si on exclut les sédiments et si on néglige la matière en suspension (Allen, 2002). De plus, les données terrestres disponibles couvrent souvent peu de niveaux trophiques, ce qui induit une représentation injuste de l'écosystème terrestre (Haye et al., 2007; Rosenbaum et al., 2008). En effet, la majorité des données sont générées à partir de tests écotoxiques impliquant des

plantes ou des invertébrés du sol (Römbke & Knacker, 2003; Kookana et al., 2006). Or, il n'y a pas encore de consensus quant au nombre de niveaux trophiques requis pour bien représenter l'écosystème bien que Payet (2004) suggérait de couvrir au moins trois phyla. Par conséquent, le modèle USEtox ne modélise actuellement pas l'impact terrestre des substances dont les métaux (Hauschild et al., 2008).

D'autres critiques subsistent par rapport à la méthodologie utilisée pour réaliser les tests de toxicité. Par exemple, les espèces animales ou végétales utilisées dans les tests écotoxiques standardisés par les agences de normalisation comme ISO<sup>4</sup> (*International Organization of Standardization*) ou OECD<sup>5</sup> (*Organization for Economic Cooperation and Development*) ne sont pas toujours représentatives de l'écosystème et sont souvent cultivées dans un milieu artificiellement contrôlé avant d'être mises en contact avec le contaminant dans le microcosme (Lowe & Butt, 2007). Les espèces ajoutées ne se sont donc jamais acclimatées ou adaptées génétiquement à leur nouveau milieu (voir section 1.5) et il est parfois difficile d'établir si l'inhibition biologique observée est due à la substance anthropique ou au changement de milieu (Vangheluwe et al., 2007).

Dans le contexte particulier des écosystèmes terrestres affectés par les métaux, les tests écotoxiques utilisent souvent des sols dopés en laboratoire avec les sels de métal ou des mélanges de minéraux et de sols (Tandy et al., 2005; Chaperon & Sauvé, 2007; Mertens et al., 2007a; Kim et al., 2008; Moreno et al., 2009). Ces sols artificiellement contaminés conduisent à une problématique importante, celle de briser à plus ou moins long terme l'équilibre établi dans le sol. En effet, l'addition de sel de métal ou d'autres sources métalliques dans un sol non contaminé facilite le contrôle du design expérimental mais fait souvent chuter le pH du sol temporairement ou de façon permanente et serait plus toxiques que les métaux ajoutés de façon lente (Speir & Ross, 2002; Hinojosa et al., 2008). Il est par conséquent difficile de déterminer si l'effet toxique observé est dû à la présence de métal ou à la chute du pH.

De plus, les unités des données écotoxiques métalliques terrestres archivées dans les bases de données écotoxicologiques ou générées par les études publiées sont très hétérogènes (Vangheluwe et al., 2007). Une part considérable des données repose sur la concentration totale

---

<sup>4</sup> <http://www.iso.org/iso/fr/home.htm>

<sup>5</sup> [http://www.oecd.org/home/0,2987,en\\_2649\\_201185\\_1\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/home/0,2987,en_2649_201185_1_1_1_1_1,00.html)

du métal et ne sont clairement pas adaptées aux principes de biodisponibilité des métaux. Une autre part des données reposent sur des fractions biodisponibles, comme la concentration soluble dans l'eau ou dans une autre solution pertinente, mais encore ici les unités varient énormément d'une donnée à l'autre. Une part encore plus petite est basée sur la concentration ionique libre du métal. Il faudra éventuellement convertir ces données de sorte à être consistant avec la méthode éventuellement adoptée par USEtox où le facteur effet EF requiert des données  $EC_{50}$  basées sur la concentration ionique libre des métaux, ce qui sera un véritable défi. Finalement, les tests écotoxiques ne considèrent généralement pas la zone d'essentialité du métal, soit la plage de concentration où la présence de métal est bénéfique, comme c'est le cas pour quelques métaux essentiels comme le Zn ou le Cu (Vangheluwe et al., 2007).

Il est donc urgent de générer des données écotoxiques à partir d'un nouveau test écotoxicologique terrestre adapté aux spécificités des métaux, basé sur un niveau trophique peu représenté dans les bases de données écotoxiques et basé sur une concentration de métal biodisponible. Pour ce faire, il faut d'abord connaître les particularités inhérentes des métaux émis dans les sols.

## **1.2. Le sort du Zn dans les sols**

### **1.2.1. Le Zn**

Le métal ciblé durant ce projet est le zinc (Zn), un élément omniprésent dans la nature et l'industrie, car c'est un métal à la fois essentiel à de faibles concentrations et toxique à concentrations élevées (Vangheluwe et al., 2007). Il est aussi possible d'échantillonner de nombreux sols mono-métalliquement contaminés par le Zn sous des structures galvanisées comme les pylônes électriques. L'étude de ces sols est idéal en laboratoire car cette contamination mono-métallique facilite l'interprétation des données comparativement aux sols contaminés par plusieurs métaux (Smolders et al., 2003; Zhang et al., 2004). De plus, le Zn fait partie d'une catégorie importante de métaux, soit les métaux divalents ( $Me^{2+}$ ) comme le Pb, le Cu, le Cd et le Ni et réagit dans le sol de façon similaire au Cd, ouvrant ainsi une possibilité de validation du projet de recherche (Kwon-Rae & Owens, 2009). Le Zn constituait donc un métal de choix pour l'élaboration d'une hypothèse de recherche doctorale. Le Tableau 1.2-1 présente quelques propriétés physico-chimiques importantes du Zn. Les prochaines sous-sections



traiteront de l'importance économique et sociale du Zn, de son origine naturelle et anthropique et de plusieurs particularités de ce métal, soit sa persistance, sa spéciation et sa biodisponibilité.

Tableau 1.2-1: Quelques propriétés du Zn (IZA, 2011)

Propriété	Description
Position dans le tableau périodique	Transition, Groupe II-B, numéro atomique 30
Valence	+2
Potentiel de réduction standard (V)	-0,7618
Masse atomique (g/mol)	65,39
Densité (g/mL)	7,14
Point de fusion (°C)	420
Point d'ébullition (°C)	907
Isotope naturel (Abondance)	<sup>64</sup> Zn (48,6%), <sup>66</sup> Zn (27,9%), <sup>67</sup> Zn (4,1%), <sup>68</sup> Zn (18,8%), <sup>70</sup> Zn (0,6%) stable pour tous ces isotopes ( $t_{1/2} > 1 \times 10^{16}$ a)

### 1.2.2. Importance économique et sociale du Zn

Les métaux et métalloïdes sont tous originaires de la croûte terrestre à des teneurs de fond variables dans le sol selon la région (Reimann & Garrett, 2005). La teneur de fond naturelle moyenne mondiale du Zn est de 90 mg/kg, avec des valeurs oscillant entre 1 et 900 mg/kg (Bradl, 2005). Le minerai de Zn exploitable d'un point de vue commercial provient principalement sous forme de sphalérite (ZnS). D'autres minéraux non exploitables, comme la franklinite (ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) ou la zincite (ZnO), contiennent des concentrations importantes de Zn. Il est le quatrième métal le plus consommé au monde après le fer, l'aluminium et le cuivre et joue un rôle important dans l'économie canadienne (Bradl, 2005). En effet, le Canada produit 7% de la production mondiale (évaluée à 10 millions de tonnes annuellement) et consomme près de 2% du Zn produit pour une consommation annuelle de 3,4 kg par personne. Plus de 47% du Zn est utilisé dans le procédé de galvanisation de l'acier, ce procédé de recouvrement par trempage ou électro-placage de Zn qui protège l'acier de la corrosion. Le reste du Zn est utilisé dans la fabrication du laiton, des pièces moulées, des produits chimiques et des matériaux de construction (IZA, 2011).

Le Zn joue aussi un rôle important dans la santé humaine et la santé des écosystèmes car il constitue un élément essentiel (à des quantités traces <0.01%) pour le bon fonctionnement du métabolisme des organismes vivants (Vangheluwe et al., 2007). En effet, il agit à titre de cofacteur dans les métallo-enzymes en catalysant la réaction enzymatique ou en assurant une

structure tridimensionnelle active de l'enzyme (McCall & Fierke, 1998). Une carence en zinc ralentie entre autre la photosynthèse chez la plante (Estevez, 2006) et engendre des problèmes immunitaires chez l'humain (IZA, 2011). Cependant, le Zn et les autres éléments essentiels ne doivent pas dépasser la fenêtre d'essentialité de l'organisme, sans quoi le métal devient toxique (Vangheluwe et al., 2007). La zone d'essentialité dépend de l'espèce et de son exposition habituelle à l'élément et par conséquent de la teneur de fond du sol (Reimann & Garrett, 2005).

### 1.2.3. Contamination anthropique du Zn

Afin de définir les concentrations naturelles des concentrations anthropiques des substances dans le sol, le ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec (MDDEP) a établi des critères seuils<sup>6</sup> dans les sols québécois pour plusieurs substances incluant les métaux. Ainsi, le critère A constitue la teneur de fond de la substance naturellement présente dans la nature, le critère B représente la concentration maximale totale permise en milieu résidentiel, récréatif ou institutionnel et le critère C constitue la concentration maximale totale permise en milieu commercial ou industriel (MDDEP, 1998).

Les sources de Zn résultant de l'activité humaine sont variées. Par exemple, des contaminations terrestres considérables de Zn proviennent des émissions des activités minières et des usines de transformation des métaux mais constituent souvent des contaminations métalliques mixtes engendrant des interactions complexes entre les différents métaux impliqués (Zn, Pb, Cu, Cd, Ni, As) (Du et al., 2008; Kwon-Rae & Owens, 2009; Lamb et al., 2009). Une autre source de Zn anthropique résulte des pratiques agricoles courantes. En effet, le Zn et d'autres éléments essentiels sont souvent ajoutés aux fertilisants et à la nourriture du bétail afin d'améliorer la croissance des plantes et la santé des animaux. Les plantes et le bétail n'assimile cependant qu'une faible proportion de ces métaux et une grande partie de ces additifs s'accumulent dans les champs (Estevez, 2006). Des accumulations totales allant de 50 à 200 mg/kg de Zn avec des valeurs extrêmes (800 mg/kg Zn) sous le critère C ont été observées (Torri & Lavado, 2008; Antoniadis et al., 2010). Or, ces faibles concentrations et la problématique de trouver un sol de référence non contaminé amendé au même niveau de matière organique ont rapidement écarté la possibilité d'utiliser ces sols pour ce projet. Finalement, les sols en surface sous les structures

---

<sup>6</sup> Critères générique pour les sols de la Politique de protection des sols et des terrains contaminés [http://www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe\\_2\\_tableau\\_1.htm](http://www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe_2_tableau_1.htm)

galvanisées contiennent aussi du Zn à des teneurs dépassant souvent le critère C (Lock & Janssen, 2005; Mertens et al., 2007b; Ruyters et al., 2012). En effet, si la galvanisation protège bien l'acier, c'est parce que la couche de Zn corrode au profit de l'acier et le Zn inorganique ainsi formé (sulfate, oxyde, etc.) se solubilise et s'accumule à la surface du sol en fonction des conditions atmosphériques (Veleva et al., 2007).

#### 1.2.4. Persistance et vieillissement d'une contamination métallique

Une des particularités fondamentales des métaux provient du fait qu'ils ne sont pas biodégradés par les organismes vivants ce qui implique que la concentration métallique totale persiste et s'accumule dans le temps tant que la source d'émission perdure. Cependant, plusieurs études ont montré que la concentration du métal biodisponible, c'est-à-dire la concentration du métal accessible aux organismes vivants et donc potentiellement toxique, diminue dans le temps (Lock & Janssen, 2003; Mertens et al., 2007b; Kim et al., 2008; Lamb et al., 2009; Smolders et al., 2009). Ce phénomène est connu sous le nom de vieillissement de la contamination métallique (*ageing*) et est dû aux interactions physico-chimiques dynamiques entre le sol, la solution du sol et le métal.

#### 1.2.5. Spéciation des métaux

Les interactions entre les trois phases du sol et les métaux impliquent un concept important dans l'étude des contaminants métalliques, soit la spéciation des métaux. La 'spéciation' d'un métal est défini comme la distribution d'un élément au travers les différentes espèces chimiques métalliques (par exemple, selon la composition isotopique ou la structure moléculaire de l'élément) et est souvent confondue avec le 'fractionnement', défini comme la classification d'un élément à partir de ses propriétés physiques ou chimiques (par exemple, par la solubilité ou la réactivité de l'élément) (Templeton et al., 2000). La distinction de ces termes n'étant pas le sujet de ce projet, le terme 'spéciation' sera employé dans ce texte mais pourrait impliquer davantage le fractionnement que la spéciation d'un point de vue chimique stricte.

La chimie spécifique du Zn dans le sol et la solution de sol est complexe. En effet, le Zn se répartit sous des formes ioniques très variées, soit solubles (Ex : chlorate  $\text{ClO}_3^-$ , chlorures  $\text{Cl}^-$ , sulfates  $\text{SO}_4^{2-}$ , nitrates  $\text{NO}_3^-$ , etc.) ou soit relativement insolubles (Ex : oxyde  $\text{O}^{2-}$ , hydroxyde  $\text{OH}^-$

, carbonates  $\text{CO}_3^{2-}$ , phosphates  $\text{PO}_4^{3-}$ , silicates  $\text{SiO}_4^{4-}$ , etc.) et possède un caractère amphotère, c'est-à-dire qu'il peut avoir un rôle acide ou basique, selon son état ionique (Bradl, 2005).

Plusieurs propriétés physico-chimiques du sol influencent la spéciation. La principale, le pH, influence l'équilibre ionique dans la solution de sol et l'adsorption/complexation du métal au travers les différents ligands organiques et inorganiques. Le pH influence aussi plusieurs autres propriétés physico-chimiques du sol, comme la concentration de matière organique dissoute (MOD), les sites anioniques des argiles, les carbonates et les oxydes (Sauvé, 2001). Un pH acide favorise la désorption du métal et augmente la concentration des métaux en solution en diminuant du même coup le coefficient de partition sol-eau  $K_d$  (Bonten et al., 2008). La concentration métallique totale peut aussi jouer un rôle significatif et dominant dans les corrélations entre les métaux et les propriétés du sol à condition qu'elle soit associée à d'autres variables comme le pH ou la matière organique (Stephan et al., 2008; Lamb et al., 2009).

Les rôles de la matière organique totale (MOT, incluant le carbone organique total, COT) et dissoute ( $\text{MOD} < 0,45\mu\text{m}$ , incluant le carbone organique dissous, COD) sur la spéciation et le fractionnement des métaux sont ambigus. La MOT diminue la concentration de métal en solution en se complexant au métal et en le rendant moins biodisponible (Cances et al., 2003; Lamb et al., 2009). Cependant, plus il y a de MOT, plus il y a de la MOD en solution. Cette MOD s'associe aussi au métal et nuit à l'adsorption du métal aux particules du sol par compétition ou par interférence physique avec les sites d'adsorption, ce qui augmente la biodisponibilité du métal (Sauvé, 2001). À l'inverse, la MOD n'aurait aucune influence dans d'autres études (Weng et al., 2002; Kwon-Rae & Owens, 2009). Les interactions complexes entre ces deux propriétés du sol rendent difficile l'étude de l'effet de la matière organique du sol sur la spéciation des métaux. Les argiles jouent aussi un rôle dans la spéciation des métaux car leur grande capacité de liaisons électrostatiques avec les cations influence substantiellement l'adsorption et la spéciation des métaux dans certains sols en les rendant moins biodisponibles (Bonten et al., 2008). La capacité d'échange cationique (CEC) d'un sol, une propriété intégratrice dépendant du pH, des argiles et de la matière organique, diminue aussi la biodisponibilité des métaux (Vangheluwe et al., 2007). Certains cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , et les métaux cationiques) feraient compétition aux métaux en s'attachant aux différents sites ou ligands anioniques et augmenteraient ainsi la biodisponibilité du métal étudié (Kwon-Rae & Owens, 2009).

### 1.2.6. Relation entre spéciation, biodisponibilité, essentialité et toxicité

Tel que discuté dans la section précédente, la biodisponibilité des métaux dépend de la spéciation et serait liée à l'activité du métal ionique libre modélisée par des modèles comme le FIAM, *Free Ion Activity Model* ou le BLM, *Biotic Ligand Model* (Campbell, 1995; Paquin et al., 2002). Le modèle BLM est une extension du modèle FIAM adapté aux écosystèmes aquatiques et implique la compétitivité qu'ont les métaux libres (alcalin, alcalino-terreux ou de transition) à s'attacher à des sites biotiques des organismes aquatiques. Cependant, la biodisponibilité du métal dans les sols serait beaucoup plus complexe à modéliser et dépendrait davantage de la fraction labile, c'est-à-dire la fraction du métal liée à des ligands dont la cinétique de dissociation-association est rapide (Nolan et al., 2005). En effet, les interfaces de la phase solide du sol (argiles, minéraux, oxydes, matière organique particulaire) ajoutent des nouvelles interactions avec les métaux, en plus de celles existantes entre les propriétés physico-chimiques de la solution du sol (ex : pH et argiles, ou MOT et MOD)(Sauvé, 2003). Ces interactions instables font parties de la fraction labile du métal. Des travaux en cours tentent d'adapter des modèles FIAM pour les milieux terrestres comme le TBLM (*Terrestrial Biotic Ligand Model*) (An et al., 2012; Wang et al., 2012), mais les conclusions obtenues à ce jour restent préliminaires. La biodisponibilité semble néanmoins mieux estimées par la concentration labile ou libre que par la concentration soluble ou totale (Nolan et al., 2005).

Présentement, il n'existe pas de méthode analytique permettant de quantifier directement le Zn libre ( $\text{Zn}^{2+}$ ), comme il est possible de le faire avec une électrode spécifique au  $\text{Cu}^{2+}$  (Stephan et al., 2008). La fraction de Zn libre peut être estimée par des chélateurs compétitifs (Catlett et al., 2002), par des résines échangeuses d'ions (Knight et al., 1998; Chaudri et al., 2000) ou par des membranes de dialyse Donnan (DMT, *Donnan Membrane Technique*) (Cances et al., 2003; Kwon-Rae & Owens, 2009). Cependant, les chélateurs compétitifs ne s'emploient que sur les sols neutres à alcalins et les résines échangeuses d'ions nécessitent beaucoup d'expériences préliminaires et de paramétrisation pour évaluer l'affinité de la résine et le temps de contact optimal (Sauvé, 2001). Quant à la membrane de dialyse Donnan, elle minimiserait la perturbation de l'échantillon mais entraînerait une perte significative du métal à cause de l'adsorption non négligeable du métal sur la membrane (Kwon-Rae & Owens, 2009). On quantifie donc la concentration de Zn labile. Elle peut être analysée par technique de gradient de diffusion dans des

films minces (DGT, *Diffusive Gradient in Thin film*) (Gaabass et al., 2009) ou par des méthodes voltamétriques de redissolution anodique (ASV, *Anodic Stripping Voltametry*) (Courchesne et al., 2006; Stephan et al., 2008). Les échantillonneurs passifs DGT et l'ASV donneraient des résultats similaires et prédiraient bien la biodisponibilité des métaux (Gaabass et al., 2009). La technique ASV a été utilisée tout le long de ce projet car les ressources techniques étaient facilement disponibles.

Avant de définir les concepts liés à l'écotoxicité terrestre du Zn, il est important de mentionner que, bien que la biodisponibilité d'un métal soit souvent liée à sa toxicité, une certaine fraction biodisponible de quelques métaux (ex : Cu, Zn, Fe, etc.) est essentielle au bon fonctionnement des cellules (Figure 1.2-1). Cette fraction métallique vitale est transportée à l'intérieur des cellules par des ligands spécialisés excrétés par certains organismes vivants (c.-à-d. les métallophores ou sidérophores). Ces métallophores contrôlent l'acquisition des métaux essentiels à l'interface membranaire des cellules mais leurs mécanismes restent à ce jour peu connus (Deicke et al., 2013). Cependant, même si le Zn est un métal essentiel et que le concept est important en biogéochimie, les prochaines sections où le concept de biodisponibilité interviendra feront référence à la zone de toxicité du Zn puisque ce projet de doctorat porte sur la modélisation de cette zone toxique.

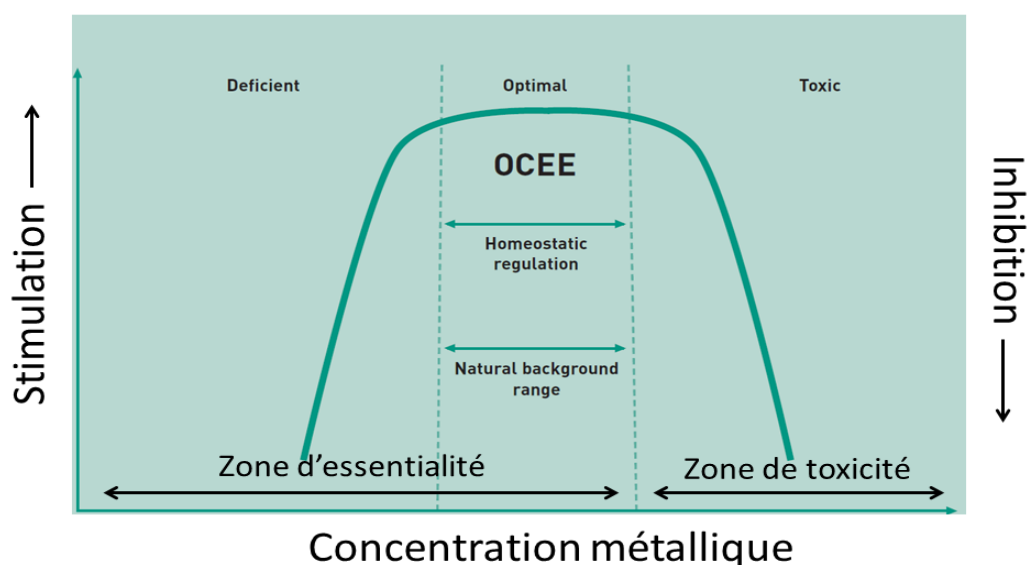


Figure 1.2-1: Zone d'essentialité et toxicité des métaux.

Adaptée de (Vangheluwe et al., 2007)

### 1.3. L'écotoxicité terrestre du Zn

La section portant sur le sort du Zn dans les sols a permis de constater que la toxicité d'un métal dépend principalement de sa fraction biodisponible gouvernée par des interactions complexes entre le sol, le Zn et les organismes en contact avec le sol. La prochaine section discute du rôle des sols et de l'effet du Zn sur les divers organismes terrestres.

#### 1.3.1. Le sol : santé et fonctions

Le sol accomplit différentes fonctions physiques, biologiques et chimiques essentielles à la vie. Il sert d'habitat pour les organismes du sol et supporte leur biodiversité, contrôle la mobilité de l'eau, participe aux cycles des nutriments, agit à titre de matrice pour la croissance des plantes, assure une stabilité physique pour les activités de la micro et macrofaune incluant l'humain et sert de tampon environnemental lors de perturbations dans le sol (Bastida et al., 2008).

La santé d'un sol, aussi appelée qualité d'un sol, constitue la capacité du sol à remplir ses fonctions, à assurer la productivité biologique et la qualité de l'environnement et à maintenir la santé des végétaux, animaux et micro-organismes (Epelde et al., 2008). Un bon indicateur de la santé d'un sol doit être simple, facile à utiliser, efficace peu importe l'environnement évalué, reproductible et peu sensible aux variations spatiales et temporelles. De plus, il doit révéler les problèmes existants de façon fiable, décrire de façon détaillée l'état des fonctions principales du sol à l'aide de données numériques générées par un nombre minimal de paramètres, intégrer les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol et être sensible aux variations de gestion et de perturbations anthropiques (Bécaert & Deschenes, 2006).

#### 1.3.2. Effet du Zn sur les différentes catégories d'organismes terrestres

Les tests de toxicité des métaux sur la macrofaune terrestre s'articulent principalement autour des invertébrés du sol. La faune animale décrite ici exclut la communauté microbienne du sol. Lorsqu'on étudie l'impact écotoxique des métaux sur la faune (et la flore), il est important de garder en tête que certains métaux s'accumulent plus ou moins facilement dans l'organisme suite à une exposition direct avec le milieu ambiant contaminé (bioconcentration) ou par la nourriture ingérée (bioaccumulation) mais que cette accumulation dans l'organisme n'est pas toujours un indicateur de toxicité. Par exemple, une étude impliquant 11 sols collectés sur le terrain

possédant une contamination mixte a montré que la concentration totale de Cu et de Zn dans le sol est bien corrélée avec la concentration de métal dans les vers de terre ayant été exposés pendant 28 jours aux sols contaminés (Lee et al., 2009) . Cependant, bien que les vers de terre accumulent jusqu'à 82mg/kg de Cu et 294mg/kg de Zn, le test de mortalité n'est pas corrélé à la concentration métallique dans le sol, suggérant que la bioconcentration n'est pas toujours liée à la toxicité.

Les plantes sont généralement très tolérantes aux métaux car elles possèdent des mécanismes de protection qui empêchent le métal d'affecter le métabolisme de la plante. Elle capterait et séquestrerait aussi les métaux dans les cellules à l'intérieur de vacuoles ou par des métallothionéines, des protéines capables de s'attacher aux métaux et de désintoxiquer le métabolisme végétal (Reichman, 2002). La phytotoxicité du Zn survient lorsque les tissus végétaux accumulent en moyenne plus de 300 mg/kg de Zn, variant entre 44 à 5000 mg/kg selon l'espèce végétale testée, la partie de la plante analysée (racines, feuilles, jeunes pousses, etc.) et la méthode de culture utilisée (Tambasco et al., 2000).

La communauté microbienne du sol est sous-représentée dans les bases de données écotoxicologiques parce qu'elle est plus difficile à étudier que les plantes et les invertébrés du sol. Pourtant elle est plus sensible aux métaux que ces deux dernières catégories (Li et al., 2009). Il va donc de soi d'orienter le développement d'un test écotoxicologique standard pour les contaminants métalliques en utilisant des fonctions liées aux microorganismes du sol. La prochaine section traite de ce sujet.

### 1.3.3. Effet du Zn sur la communauté microbienne du sol

L'étude de la communauté microbienne du sol est une avenue pertinente pour le développement d'un nouveau test de toxicité basé sur d'autres organismes terrestres que les plantes ou les invertébrés du sol. La communauté microbienne du sol constitue plus de 90% de la biomasse terrestre, est indigène, est en contact direct avec le sol et est exposée de façon constante aux métaux de ce compartiment (Rutgers & Breure, 1999; Reichman, 2002; Li et al., 2009). Les microorganismes du sol sont souvent analysés comme une « boîte noire » comprenant plusieurs organismes inférieurs à 0,015 mm de diamètre comme les bactéries, microchampignons, micro-algues, levures et virus (Paul, 2007). Au sens biologique strict, il n'est alors pas possible de parler



de la communauté microbienne comme un phylum ou même une espèce particulière. Cependant, il est possible en écotoxicologie de réaliser des tests de toxicité sur les microorganismes en mesurant la somme des activités des différentes espèces de la communauté, et ce même s'il ne s'agit pas d'une espèce particulière (Smolders et al., 2004; Speir et al., 2007b; Hinojosa et al., 2008).

Le but de cette section est de présenter les différentes catégories d'indicateurs microbiens, soit la biomasse, l'activité et la diversité de la communauté microbienne.

#### *1.3.3.1. Biomasse microbienne*

Plusieurs auteurs ont tenté de corréler la biomasse microbienne avec l'état de santé des sols ou la toxicité des métaux et autres contaminants (Chaudri et al., 1999; Tandy et al., 2005; Anderson et al., 2009; Li et al., 2009; Plaza et al., 2010). Bien que certaines études ont montré un effet significatif négatif des métaux sur la biomasse microbienne (Chaudri et al., 1999; Anderson et al., 2009), elle serait davantage corrélée au contenu organique du sol et aux autres indicateurs microbiens qu'à la concentration métallique du sol (Tandy et al., 2005; Li et al., 2009; Plaza et al., 2010). De plus, les résultats sont souvent très hétérogènes dû à la grande variabilité spatiale et temporelle des sols de terrains. La biomasse microbienne n'est donc pas la meilleure catégorie d'indicateurs microbiens à utiliser pour le développement d'un test écotoxicologique.

#### *1.3.3.2. Activité microbienne*

Les fonctions métaboliques des organismes vivants (incluant les microorganismes) sont gouvernées par les enzymes, des protéines spécialisées produites par les cellules vivantes et catalysant les réactions intra ou extracellulaire. Il existe de nombreuses méthodes d'analyse de l'activité microbienne basées sur une ou des fonctions métaboliques des microorganismes. Par exemple, la minéralisation du carbone et la respiration sont souvent analysées pour estimer l'activité microbienne du sol via la production de CO<sub>2</sub> et la consommation d'O<sub>2</sub> (Sylvia et al., 2005). Cependant, les processus globaux associés au cycle du carbone semblent davantage corrélés à la matière organique du sol qu'aux métaux; ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'un grand nombre de microorganismes participent à la production de CO<sub>2</sub> (Bastida et al., 2008). La minéralisation de l'azote consiste à convertir l'azote organique en ammoniac (ammonification)

qui sera ensuite transformé en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) et nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) par nitrification (Paul, 2007). Certaines études ont montré que la nitrification est sensible aux métaux (Killham & J., 2002; Broos et al., 2005) mais d'autres ont noté une insensibilité de la nitrification face aux métaux (Smolders et al., 2003; Mertens et al., 2007b). De plus, le fait que seul le cycle de l'azote soit traité rend cet indicateur moins attrayant s'il n'est pas jumelé avec d'autres indicateurs couvrant les autres cycles biogéochimiques. La concentration des adénines nucléotides seraient un autre paramètre intéressant à mesurer car il est lié aux cellules actives du sol (Carter & Gregorich, 2008). Le principal problème de ce type de technique réside dans l'extraction difficile des nucléotides, car plusieurs substances présentes dans le sol inhibent la réaction de l'adénosine triphosphate (ATP) ou forme un complexe avec l'ATP, comme les acides humiques, le  $\text{Mg}^{2+}$ , le  $\text{Ca}^{2+}$  ou le  $\text{Fe}^{3+}$  (Alef & Nannipieri, 1995).

L'activité enzymatique (AE) du sol serait une autre alternative pour estimer l'activité microbienne du sol (Nannipieri et al., 2002). L'activité enzymatique est en fait une mesure de la cinétique enzymatique, c'est-à-dire de la vitesse à laquelle un substrat spécifique à une enzyme peut être transformé en un produit. L'intérêt face à cet indicateur provient du fait que les enzymes sécrétées par la communauté microbienne du sol exercent des rôles majeurs dans les cycles biogéochimiques, la croissance des plantes et la décomposition des composés organiques en sous-unités assimilables (German et al., 2011). De plus, les enzymes du sol sont généralement plus sensibles aux métaux qu'aux contaminants organiques (Kandeler et al., 1996; Chaperon & Sauvé, 2007; Hinojosa et al., 2008; Lee et al., 2009; Li et al., 2009). Il faut néanmoins garder en tête qu'une portion des enzymes du sol résulte de l'activité métabolique des plantes et des animaux du sol et que la source des enzymes est souvent méconnue (Burns et al., 2013). De plus, il n'existerait pas un essai enzymatique unique qui soit efficace pour définir l'état de santé de tous les sols exposés à différents métaux (Epelde et al., 2008). Il faut par conséquent mesurer l'activité de plusieurs enzymes du sol couvrant les principaux cycles biogéochimiques pour s'assurer d'avoir un portrait global de l'état de santé d'un sol.

#### 1.3.3.3. *Diversité microbienne*

Une dernière catégorie d'indicateur microbien est la diversité. La diversité microbienne peut être étudiée par deux axes : la diversité structurelle ou la diversité fonctionnelle. La biodiversité structurelle est en pleine expansion et est basée sur l'étude de la composition génétique des

procaryotes ou des microchampignons du sol (Rajendhran & Gunasekaran, 2011). De nombreuses méthodes d'analyses moléculaires impliquant l'ADN/ARN voient le jour chaque année et permettent d'analyser plus de 90% de la communauté terrestre, soit la population des microorganismes dominants (Paul, 2007). Plusieurs études ont montré que les sols contaminés par les métaux ont un profil génétique différent des sols non contaminés (Renella et al., 2005a; Anderson et al., 2009). Les analyses de la biodiversité structurelle ont beaucoup de potentiel dans les domaines environnementaux surtout si elles sont combinées à d'autres indicateurs de santé des écosystèmes. Cependant, ces méthodes analytiques requièrent des ressources humaines et matérielles considérables (Bastida et al., 2008). De plus, un changement structurel de la communauté microbienne n'implique pas nécessairement l'altération de l'intégrité fonctionnelle de la communauté. Ainsi, une autre forme de diversité, la diversité dite fonctionnelle, serait plus adéquate pour étudier l'impact toxique des métaux (Caldwell, 2005; Epelde et al., 2012).

La diversité fonctionnelle consiste à évaluer les capacités de la communauté microbienne à accomplir différentes fonctions. Par exemple, l'analyse du profil physiologique de la communauté microbienne (*CLPP*, *Community Level Physiological Profile*), mieux connue sous la méthode des plaques Biolog, ou l'analyse de la tolérance de la communauté à la pollution induite (*PICT*, *Pollution Induced Community Tolerance*), évaluent l'habileté des microorganismes à utiliser différentes sources de carbone correspondant chacune à une fonction métabolique spécifique (Rutgers & Breure, 1999; Lock & Janssen, 2005; Anderson et al., 2009). Les méthodes CLPP et PICT sont simples et rapides, reproductibles et spécifiques à l'habitat. Cependant, seul le cycle du carbone est couvert et les longues périodes d'incubation (72h) peuvent induire des changements significatifs dans la communauté microbienne et dans la spéciation des métaux, ce qui en limite fortement le potentiel d'utilisation à titre d'indicateurs de la toxicité des métaux (Epelde et al., 2008). Une alternative très prometteuse d'indicateur de diversité fonctionnelle est l'agrégation de l'activité enzymatique. Elle est possible lorsque l'activité de plusieurs enzymes est mesurée et que toutes ces réponses diverses sont traitées comme un tout. Cette idée est attrayante car elle constitue un indicateur intégrateur de l'état de santé et de la diversité fonctionnelle des sols contaminés mais elle a été peu exploitée dans le passé (Hinojosa et al., 2004b; Epelde et al., 2008; García-Ruiz et al., 2008).

## 1.4. Effet du Zn sur les enzymes du sol

La prochaine section discute en détail de l'intérêt des enzymes comme indicateurs de la toxicité des métaux, en expliquant leurs particularités, la détermination de leur activité en laboratoire et l'influence des métaux sur celles-ci. Les limites de l'utilisation des enzymes comme indicateurs de toxicité des métaux seront finalement abordées.

### 1.4.1. Compartimentation des enzymes

La localisation des enzymes dans les différents compartiments du sol est complexe et mal connue. En effet, les enzymes du sol peuvent se situer : à l'intérieur ou attachées à des cellules vivantes, dans les cellules en dormances ou mortes, dans les débris cellulaires, libres ou complexées au substrat dans la solution du sol, complexées aux molécules humiques adsorbées aux colloïdes inorganiques ou complexées aux tanins issus des plantes (Burns et al., 2013).

Il existe deux types d'enzymes : les intracellulaires et les extracellulaires. Les enzymes intracellulaires interviennent dans l'activité métabolique des cellules actives du sol et constituent donc un indicateur de l'activité microbienne globale du sol (Nannipieri et al., 2002). Certaines cellules en dormance ou mortes en contiendraient une fraction. Quant aux enzymes extracellulaires, elles sont soit libres ou attachées à diverses composantes du sol. Ces enzymes attachées sont très étudiées car elles seraient stables pendant plusieurs mois voire plusieurs années puisqu'elles seraient davantage protégées de la dénaturation thermique et des protéases que ne le sont les enzymes libres (Knight & Dick, 2004). L'activité des enzymes extracellulaires est intéressante pour le développement d'un indicateur microbiologique car l'activité des enzymes extracellulaires serait le reflet à long terme de l'activité microbienne et de la capacité du sol à protéger et stabiliser les enzymes (German et al., 2011; Henry, 2012; Burns et al., 2013).

### 1.4.2. Les essais enzymatiques

Avant d'aller plus loin, il est important de clarifier que l'activité enzymatique mesure l'activité des enzymes déjà présentes dans le sol et qu'aucune enzyme n'est ajoutée. De plus, les essais enzymatiques reposent sur la mesure de la cinétique enzymatique plutôt que sur la concentration des enzymes du sol car l'extraction des enzymes en unités intactes est une tâche laborieuse (Knight & Dick, 2004). Les protocoles des essais enzymatiques sont conçus pour déterminer un

potentiel d'activité enzymatique car les conditions environnementales des essais sont établies de sorte à promouvoir une activité enzymatique optimale. Par exemple, la concentration ajoutée du substrat est en excès afin d'assurer une vitesse enzymatique optimale, le choix du pH du tampon et de la température optimale repose sur des études enzymatiques antérieures effectuées sur les sols, le sol est mis en solution de façon à former une boue qui facilite le déplacement du substrat vers l'enzyme. De plus, le temps d'incubation est ajusté en fonction de la cinétique de production enzymatique de sorte à décélérer l'activité mais à rester dans les plages de linéarité de production de l'analyte (German et al., 2011).

Les essais enzymatiques mesurent donc l'activité des enzymes attachées aux cellules ou débris cellulaires ou aux composantes du sol (Knight & Dick, 2004). Il est par conséquent difficile de savoir où étaient localisées ces enzymes mais il existe quelques astuces. Par exemple, l'évaluation de l'activité enzymatique extracellulaire abiotique (originaires du vivant mais non associées à l'activité métabolique d'une cellule vivante) pourrait se faire lors d'essais à court-terme afin de limiter la croissance microbienne ou la lyse cellulaire durant l'essai (Nannipieri et al., 2002). Il faut cependant garder en tête qu'une fraction de cette activité est malgré tout liée à l'activité biotique ou aux enzymes libres dans le sol durant l'incubation. Des agents bactériostatiques (ex : toluène) et l'irradiation ont été testés pour inhiber la synthèse enzymatique des cellules vivantes et pour stériliser le sol. Cependant, l'efficacité de ces méthodes est critiquée, car elles induiraient la dénaturation ou la plasmolyse de certaines cellules libérant certaines de leurs enzymes intracellulaires (Tabatabai, 1994; German et al., 2011).

#### 1.4.3. Effet du Zn sur l'activité enzymatique

Le mécanisme d'action toxique de certains métaux sur les enzymes est complexe. D'une part, le Zn peut agir à titre d'inhibiteur enzymatique partiel ou total en se liant à un groupement spécifique (carboxylique, sulfhydryle, histidines, etc.) dans ou à proximité du site actif de l'enzyme (Speir & Ross, 2002; Kim et al., 2008). D'autre part, le Zn peut aussi réduire indirectement l'activité enzymatique du sol en affectant d'abord les microorganismes qui à leur tour produisent moins d'enzymes (Li et al., 2009). Il ne faut pas oublier en plus que le Zn agit aussi à titre de cofacteur (donc est bénéfique) pour certaines métallo-enzymes comme la phosphatase alcaline ou les phospholipases-C (McCall & Fierke, 1998).

Plusieurs auteurs ont construit des courbes dose-réponse à partir de l'activité d'une enzyme du sol affectée par le Zn (Chaperon & Sauvé, 2007; Speir et al., 2007b; Hinojosa et al., 2008; Kim et al., 2008). Cependant, la toxicité du Zn sur les enzymes du sol varie largement dans la littérature et les opinions scientifiques divergent. Par exemple, certains suggèrent que la  $\beta$ -glucosidase serait un bon indicateur de la toxicité du Zn (Lee et al., 2009; Moreno et al., 2009) alors que d'autres stipulent que les enzymes du cycle du carbone y sont moins sensibles (Kandeler et al., 1996; Epelde et al., 2008). Dans le même ordre d'idées, l'uréase serait la meilleure enzyme pour signaler la toxicité des métaux (Qin & Cabral, 2002; Speir & Ross, 2002), alors qu'elle serait la moins sensible chez d'autres (Renella et al., 2005a; Hinojosa et al., 2008). Les mêmes constatations peuvent être faites pour les autres enzymes. Il est donc impossible de sélectionner une seule enzyme pour évaluer la toxicité des métaux et il est aussi difficile de cibler les enzymes d'intérêt pour un métal donné (Speir & Ross, 2002; Bécaert & Deschenes, 2006).

#### 1.4.4. Limites des essais enzymatiques

Malgré leur important potentiel, quelques obstacles persistent quant à l'utilisation généralisée des essais enzymatiques comme indicateurs de toxicité des métaux. Le principal problème repose sur le fait que les conditions optimales utilisées pour obtenir un potentiel d'activité enzymatique sont rarement présentes dans les sols naturels. En effet, le substrat utilisé dans les protocoles standards opérationnels (PSO) est souvent synthétique, la température et le pH du sol des PSO n'ont souvent rien à voir avec les conditions de terrain, les conditions d'humidité réelles limitent la diffusion du substrat vers les enzymes, etc. Ces conditions optimales mais artificielles rendent l'interprétation des résultats enzymatiques ardue car il est difficile d'établir la connexion entre les résultats de laboratoire et les résultats de terrain (Speir & Ross, 2002). Certains ont suggéré de réaliser les essais enzymatiques dans des conditions d'incubation représentatives des conditions de terrain et de les comparer aux essais enzymatiques conventionnels (Nannipieri et al., 2002; German et al., 2011). Par exemple, certaines études ont remplacé les solutions-tampons par de l'eau (Chaperon & Sauvé, 2007; Dussault et al., 2008) ou ont modifié le pH optimal du tampon pour un pH plus près du pH naturel des sols (Li et al., 2009). Les résultats obtenus ne représenteraient plus un potentiel d'activité enzymatique mais donneraient des résultats plus réalistes des conditions *in situ* du sol. Cependant, cette alternative conduit à une nouvelle

problématique, celle de l'ubiquité de l'influence du pH sur l'activité enzymatique et la spéciation des métaux, problématique expliquée dans la section suivante.

#### 1.4.5. Influence des conditions expérimentales lors des essais enzymatiques

Parce que le pH influence l'activité enzymatique, les essais enzymatiques standards utilisent généralement des solutions tampons fixant le pH durant l'incubation. En effet, une fluctuation du pH pourrait altérer l'ionisation et la solubilité de l'enzyme, du substrat et du cofacteur et modifier la cinétique de la réaction enzymatique (Tabatabai & Dick, 2002). Par exemple, la production d'ammonium dans les essais d'uréase réalisés sans tampon alcalinise la solution pendant l'incubation jusqu'à ce qu'elle s'auto-tamponne à un pH proche de 9 (Qin & Cabral, 2002). De plus, l'utilisation des tampons est nécessaire afin d'obtenir un potentiel d'activité enzymatique maximal permettant la comparaison entre les différents sols testés et les différentes études réalisées (Burns et al., 2013). Les essais enzymatiques ont été développés en utilisant des sols non-contaminés. Cependant, il existe une inquiétude importante liée à l'utilisation des tampons lors d'essais enzymatiques sur des sols contaminés par les métaux. La composition chimique et le pH du tampon pourrait changer la spéciation et la biodisponibilité du métal lors de l'essai, ce qui pourrait modifier les interactions entre les composantes chimiques du tampon, les espèces métalliques, les composantes du sol, les enzymes et les substrats et affecter la cinétique enzymatique (Chaperon & Sauvé, 2007; Dussault et al., 2008). On obtiendrait alors des résultats enzymatiques biaisés qui ne représenteraient pas l'activité réelle des enzymes en contact avec le métal *in situ*, ce qui est inacceptable dans la perspective du développement d'un test de toxicité de terrain des métaux basé sur l'activité enzymatique. De plus, le pH optimal de certaines enzymes dépendrait du tampon mais aussi des sols testés (Turner, 2010). Par exemple, le pH de l'uréase oscillerait entre 6-7 et 9-10 (Alef & Nannipieri, 1995). Un pH de 6 étant bien différent d'un pH de 10, on peut se demander lequel choisir dans une pareille situation.

Tel que mentionné précédemment, l'alternative des essais sans tampon a été proposée par quelques scientifiques afin d'obtenir un index enzymatique sous des conditions *in situ* (Ross, 1987; Kandeler & Gerber, 1988; Kandeler et al., 1996; Schinner et al., 1996; Caldwell et al., 1999; Chaperon & Sauvé, 2007; Dussault et al., 2008). Même si le pH ne fluctue pas durant les essais enzymatiques, les échantillons incubés dans l'eau pourraient s'ajuster au pH du sol avant l'incubation et le pH du sol pourrait alors influencer l'activité enzymatique. La problématique est

de savoir si le changement d'activité enzymatique réalisée dans de l'eau est dû au pH des sols, au métal ou à une combinaison des deux. D'autres scientifiques suggèrent d'utiliser le tampon proposé dans les essais standards mais à un pH plus près du pH des sols; les résultats obtenus pourraient ne pas être optimaux mais le pH ne fluctuerait pas durant l'incubation (Sinsabaugh et al., 2000; Li et al., 2009). Cette seconde alternative n'empêche pas la possibilité que la composition chimique du tampon affecte la spéciation du métal en s'y associant ou en changeant l'équilibre ionique du sol. Il est par conséquent nécessaire d'éclaircir cette problématique afin d'établir un design expérimental judicieux lors de la réalisation d'essais enzymatiques sur des sols contaminés par les métaux.

## **1.5. Tolérance et stabilité fonctionnelle des microorganismes du sol exposés aux métaux**

### **1.5.1. La tolérance**

En étudiant les sols contaminés par les métaux depuis longtemps, il est essentiel d'introduire un mécanisme biochimique important principalement engendré par les contaminants persistants. Un contaminant peut affecter/tuer les microorganismes les plus sensibles à court terme et réduire ou modifier la biomasse, la diversité ou l'activité de la communauté. Cependant, cette dernière peut devenir tolérante au métal à plus ou moins long-terme en s'adaptant (génétiquement, au travers plusieurs générations) ou en s'acclimatant (tolérance de l'espèce sans modification génétique) à certaines concentrations de métal dans le sol (Lock & Janssen, 2005; Ruyters et al., 2012). L'adaptation génétique peut impliquer une perte de diversité de la communauté au profit des espèces les plus tolérantes (Lock & Janssen, 2005). Cette perte de diversité pourrait être néfaste car elle élimine potentiellement des espèces microbiennes qui assuraient des processus biogéochimiques clé dans l'écosystème (Yachi & Loreau, 1999). L'acclimatation physiologique, elle, gaspille l'énergie de la cellule pour maintenir l'intégrité de ces fonctions métaboliques. Cette énergie utilisée pour induire des changements phénotypiques ou réparer la cellule a été détournée des autres processus métaboliques essentiels (Vangheluwe et al., 2007).

Suite à des mécanismes de tolérance, la communauté microbienne peut se réorganiser et retrouver des fonctions biogéochimiques normales après un certain temps. Dans ce cas, la présence anthropique de métaux pourrait 1) ne pas induire de changement apparent de l'activité des



microorganismes du sol à long-terme ou 2) diminuer la sensibilité au métal de la communauté microbienne, phénomène observé via une augmentation des données écotoxiques (ex :  $EC_{50}$  plus élevée) (Pereira e Silva et al., 2013). Si cette tolérance semble un processus positif aux premiers abords, elle est perçue comme un impact environnemental négatif par la communauté scientifique (Wallenstein & Hall, 2012). En effet, le développement de la tolérance suite à un stress environnemental persistant pourrait augmenter la vulnérabilité de la communauté microbienne aux épisodes perturbateurs additionnels en rendant les fonctions métaboliques de l'écosystème entier moins stables (De Lange et al., 2010). La question est donc : Comment évaluer l'effet des métaux sur la communauté microbienne de sols contaminés depuis longtemps dans lesquels des mécanismes de tolérance peuvent avoir pris place?

Quelques auteurs ont étudié l'impact de la tolérance d'un métal par la méthode PICT. Bien que cette méthode ait permis d'identifier les mécanismes de tolérance dans le passé en mesurant des valeurs de  $EC_{50}$  plus élevées (Brandt et al.; Lock & Janssen, 2005), quelques limites de la méthode freine son utilisation pour l'étude écotoxicologique des métaux sur les microorganismes du sol. Par exemple, le protocole PICT requiert l'extraction et la culture des microorganismes du sol, étape qui n'évalue qu'une très faible proportion des microorganismes du sol. De plus, le taux d'assimilation de substrats carboniques est mesuré, mais les autres cycles biogéochimiques importants (N, P, S) ne sont pas considérés. Finalement, la longue période d'incubation (72 h) nécessaire à la méthode PICT peut induire des changements phénotypiques et structuraux significatifs durant les essais, ce qui doit être évité (Epelde et al., 2008). Une autre approche de plus en plus étudiée serait de soumettre la communauté microbienne tolérante au métal à un élément perturbateur contrôlé en laboratoire et de comparer la dynamique de récupération de ses fonctions biogéochimiques à celle d'une communauté saine (c.-à-d. non tolérante au métal). Cette approche s'appelle la stabilité fonctionnelle.

### 1.5.2. La stabilité fonctionnelle

La stabilité fonctionnelle (SF) est définie comme la capacité d'un écosystème à faire face aux perturbations environnementales et à maintenir un état de santé normal. Elle est caractérisée par la résistance, c'est-à-dire la capacité de l'écosystème à résister à la perte fonctionnelle immédiatement après la perturbation, et la résilience (aussi appelée récupération), c'est-à-dire la capacité dynamique de l'écosystème à retrouver ses fonctions originales après perturbation

(Griffiths & Philippot, 2013). L'étude de la SF implique qu'un stress (c.-à-d. persistant, long-terme) ou une perturbation (c.-à-d. temps défini, court-terme) contrôlé en laboratoire soit imposé sur l'échantillon étudié et que la résistance et la résilience d'une ou des fonctions ciblées soient mesurées après le stress ou la perturbation. Durant la dernière décennie, plus de 40 études ont utilisé la SF pour évaluer la santé des sols ou l'écotoxicité terrestre (Griffiths & Philippot, 2013).

Souvent, la stabilité fonctionnelle est évaluée sur des écosystèmes déjà stressés par une utilisation anthropique des terres ou par une contamination. L'étude de ces écosystèmes pré-stressés est un axe particulier de la SF et est connue sous la terminologie 'co-tolérance' (Tobor-Kapłon et al., 2006a). Le tiers des études présentées dans la revue de Griffiths and Philippot (2013) évalue la co-tolérance de sols pré-stressés par des métaux en utilisant la SF, démontrant que cette approche est judicieuse, actuelle et bien adaptée au contexte courant des écosystèmes multi-stressés. Deux réponses opposées peuvent survenir : la co-tolérance positive et la co-tolérance négative. La co-tolérance positive implique que la communauté d'un sol pré-stressé est plus apte à se remettre de périodes perturbatrices additionnelles. La co-tolérance négative indique qu'un sol pré-stressé est davantage affecté par des épisodes perturbateurs additionnels qu'un sol non stressée (Vinebrooke et al., 2004).

L'expression des résultats de SF varie grandement dans la littérature. Pour simplifier le traitement des données, plusieurs auteurs ont développés des scores de SF (Griffiths et al., 2000; Orwin & Wardle, 2004; Bécaert et al., 2006; Tobor-Kapłon et al., 2006b; Chaer et al., 2009a; Mertens et al., 2010; Zhang et al., 2010; Epelde et al., 2012). Deux de ces scores, le *Relative Soil Stability Index* (RSSI) et le score *Zhang*, intègrent la dynamique de récupération après une perturbation (Bécaert et al., 2006; Zhang et al., 2010). Le Tableau 1.5-1 présente ces scores. La méthode RSSI est particulièrement intéressante car elle évalue la stabilité des fonctions enzymatiques du sol et utilise un chauffage à 60°C comme perturbation en laboratoire. Cette température légèrement supérieure à la température maximale tolérée par les microorganismes mésophiles et les enzymes du sol perturbe suffisamment les fonctions enzymatiques du sol mais permet une récupération enzymatique dans la plupart des cas (Bécaert et al., 2006). L'ensemble de ces caractéristiques rendent l'utilisation de cette technique attrayante pour le développement d'une méthodologie d'évaluation de la toxicité à long-terme des métaux dans les sols.

Le principe de la méthode consiste à faire un suivi temporel de l'activité enzymatique des sols perturbés (voir Figure 1.5-1). Ensuite, en déterminant l'aire sous la courbe des graphiques d'activité enzymatique en fonction du temps des sols perturbés et non perturbés, un ratio quantitatif perturbé/non perturbé est établi et correspond à l'indice relatif de la stabilité des sols, le RSSI (*Relative Soil Stability Index*).

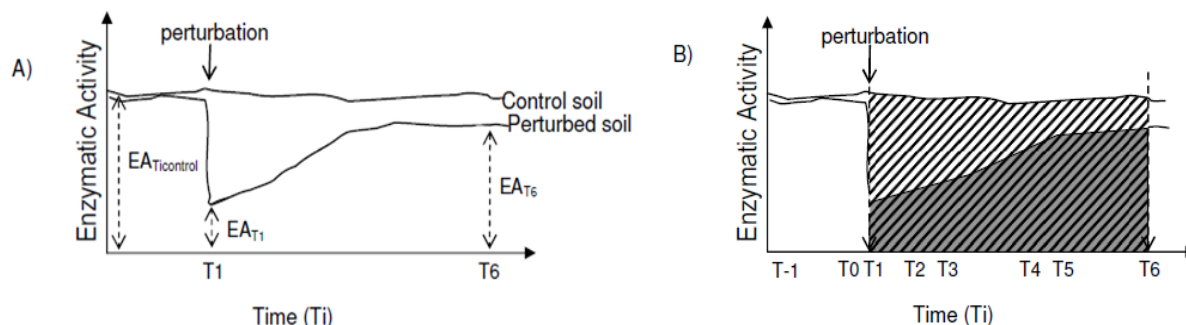


Figure 1.5-1 : A) Schématisation de l'effet temporel de la perturbation sur l'AE

B) Détermination du RSSI =  $\int AEdt$  en gris foncé sur  $\int AEdt$  hachurée total

(Adaptée de Bécaert, 2004)

Bien que la méthode RSSI ait montré une sensibilité au pesticide 2,4-D<sup>7</sup> et au Cu par une diminution du score RSSI dans les sols contaminés, considérant qu'un score RSSI élevé est signe d'une plus grande SF, des sols dopés ont été étudiés et peu de sols ont été analysés (Bécaert et al., 2006; Dussault et al., 2008). De plus, la méthode RSSI – et par ailleurs tous les autres scores SF – a été utilisée de façon comparative, c'est-à-dire que le RSSI du sol contaminé était comparé à celui du sol non contaminé pour voir si la valeur des scores était significativement différente. Cette comparaison ne permet pas d'obtenir une régression de type concentration-réponse à partir de laquelle peut être extraite une donnée écotoxique. Par contre, en corrélant le score RSSI à la concentration de Zn biodisponible du sol, il serait possible d'obtenir une EC<sub>50</sub>. Néanmoins, il faudrait d'abord optimiser les scores SF pour considérer l'historique physico-chimique du site d'échantillonnage, une lacune majeure observée pour l'ensemble des scores SF disponibles. Sans cette considération, les résultats enzymatiques ne seraient pas à la même échelle d'un site à

<sup>7</sup> Pesticide : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

l'autre car l'activité enzymatique dépend des propriétés physico-chimiques du site (Vangheluwe et al., 2007).

Une fois optimisée, les scores de stabilité enzymatique obtenus pour chaque enzyme pourraient être agrégés de sorte à obtenir un indice de diversité fonctionnelle enzymatique. Cet indice unique et holistique constituerait une méthodologie puissante et intégratrice si elle est sensible à une contamination à long-terme pour le Zn.

Tableau 1.5-1: Description des scores de stabilité fonctionnelle disponibles

Propriétés			Score SF ID		Description	Équation SF lié au sol de référence	Équation SF lié au sol contaminé
Scores existants	Deux scores par paire de sols Approche comparative	Dynamique (intégral)	#1	Bécaert (Bécaert et al., 2006)	Score RSSI original intégré sur 11 jours	$\frac{\int_1^{11} R_D(t) dt}{\int_1^{11} R_{UD}(t) dt}$	$\frac{\int_1^{11} C_D(t) dt}{\int_1^{11} C_{UD}(t) dt}$
			#2	Zhang (Zhang et al., 2010)	Score intégré sur 11 jours	$\int_1^{11} \left( \frac{R_D(t)}{R_{UD}(t)} \right)^{\times 100} dt$	$\int_1^{11} \left( \frac{C_D(t)}{C_{UD}(t)} \right)^{\times 100} dt$
		Statique (temps fixé)	#3	Griffiths (Griffiths et al., 2000)	Score intégré sur 11 jours	$(R_{UD}(11) - R_{UD}(1)) / R_D(11) \times 100$	$(C_{UD}(11) - C_{UD}(1)) / C_D(11) \times 100$
			#4	Chaer (Chaer et al., 2009a)	Score intégré sur 11 jours	$\  R_D(11) / R_{UD}(11) - 1 \  \times 100$	$\  C_D(11) / C_{UD}(11) - 1 \  \times 100$
			#5	Orwin & Wardle (Orwin & Wardle, 2004)	Score intégré sur 11 jours	$\left( \frac{2( R_{UD}(0) - R_D(1) )}{ R_{UD}(0) - R_D(1)  +  R_{UD}(11) - R_D(11) } \right) - 1$	$\left( \frac{2( C_{UD}(0) - C_D(1) )}{ C_{UD}(0) - C_D(1)  +  C_{UD}(11) - C_D(11) } \right) - 1$

C = contaminé, R = sol de référence, D = perturbé (*disturbed*), UD = non perturbé (*undisturbed*), (t) = mesuré au jour t ou intégré dans le temps

## **CHAPITRE 2. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS**

### **2.1. Problématique**

Le modèle consensuel USEtox utilisé en ÉICV n'évalue actuellement pas l'écotoxicité des substances dans les sols car il manque de données écotoxiques terrestres couvrant suffisamment de phyla ou niveaux trophiques pour avoir une modélisation représentative de l'écosystème terrestre. De plus, la plupart des données écotoxiques disponibles ont été obtenues à partir de la concentration de métal total, sur des sols dopés en laboratoire et sur des espèces pas nécessairement représentatives du milieu étudié. Le développement d'un nouveau test écotoxique terrestre adapté aux métaux est par conséquent très urgent.

L'activité enzymatique serait un indicateur de choix car elle pourrait à la fois évaluer l'activité microbienne et la diversité fonctionnelle en agrégeant l'activité de plusieurs enzymes. De plus, les essais enzymatiques sont simples, rapides, peu coûteux, et plus sensibles aux métaux que d'autres indicateurs basés sur la communauté microbienne, les plantes et les invertébrés du sol. Il faut cependant s'assurer que les conditions expérimentales utilisées lors de la réalisation des essais enzymatiques soient adéquates dans le contexte d'une contamination métallique.

Puisque les enzymes sont principalement produites par la communauté microbienne et que cette dernière peut s'adapter ou s'acclimater à une contamination persistante émise lentement dans le sol, il serait possible que la communauté microbienne se soit réorganisée pour tolérer le métal sans que l'activité enzymatique apparente en soit affectée. Si c'était le cas, il faudrait trouver une nouvelle approche pour évaluer la toxicité du métal à long-terme. Sachant qu'une communauté microbienne tolérante aux métaux peut être instable lors d'épisodes perturbateurs additionnels, cette perte de stabilité des fonctions enzymatiques pourrait être un meilleur indicateur de toxicité des métaux que l'activité enzymatique conventionnelle.

## 2.2. Hypothèse de recherche

L'hypothèse de recherche de ce projet doctoral est :

*La diversité fonctionnelle d'un sol basée sur l'agrégation de ses résultats enzymatiques est un bon indicateur ( $R^2 > 0,50$ , soit le seuil de pertinence biologique) de la toxicité à long-terme du Zn. La stabilité enzymatique agrégée d'un sol est considérablement plus sensible au Zn (c.-à-d.  $EC_{50}$  plus faible) que l'activité enzymatique agrégée.*

## 2.3. Objectifs de recherche

Les objectifs de recherche découlant des problématiques soulevées dans la revue de littérature et de l'hypothèse de recherche sont :

Principal

Développer une méthodologie d'évaluation de toxicité terrestre à long-terme du Zn et basée sur la diversité fonctionnelle enzymatique des sols

Spécifiques

- 1) Sélectionner la solution d'incubation (tampon ou eau) pour laquelle sa composition chimique ne modifie pas la toxicité du Zn dans les sols tout en assurant un pH stable pendant les essais enzymatiques et des résultats enzymatiques optimaux
- 2) Élaborer un score de stabilité fonctionnelle basé sur les enzymes du sol qui tienne compte des particularités physico-chimiques propres à chaque site échantillonné tout en étant sensible à un gradient de Zn
- 3) Générer une donnée écotoxique  $EC_{50}$  à partir d'un indice de diversité fonctionnelle enzymatique agrégé (activité ou stabilité) bien corrélé ( $R^2 > 0,50$ ) au Zn de sols contaminés collectés sur le terrain.

## 2.4. Méthodologie générale

Le schéma suivant (Figure 2.4-1) illustre les 3 blocs principaux du projet: le design expérimental, les analyses en laboratoire et le traitement des données.

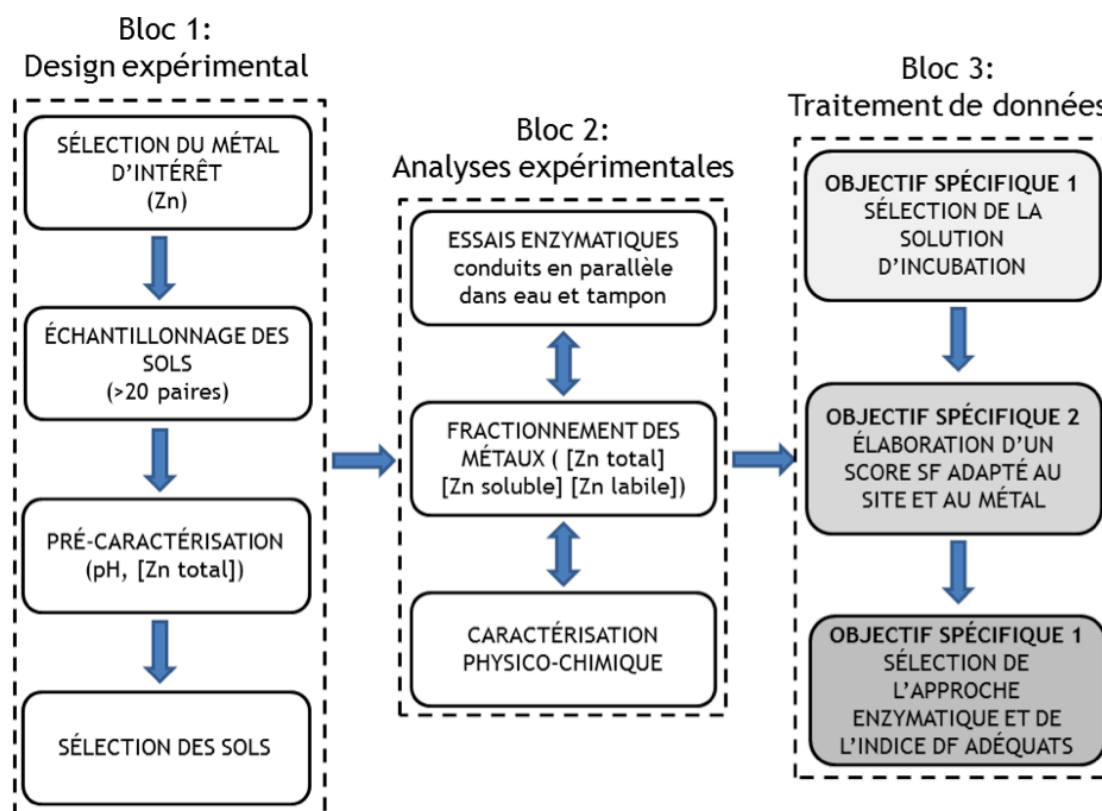


Figure 2.4-1 : Les trois principaux blocs méthodologiques derrière le projet de doctorat. Les blocs et les flèches à simple pointe sont séquentiels, alors que les flèches à double pointe indiquent que les étapes impliquées ont été réalisées en parallèle.



La figure 2.4-2 énonce les principales étapes méthodologiques associées aux 3 objectifs spécifiques du projet. Ces étapes sont détaillées dans les trois prochains chapitres (un chapitre par objectif).

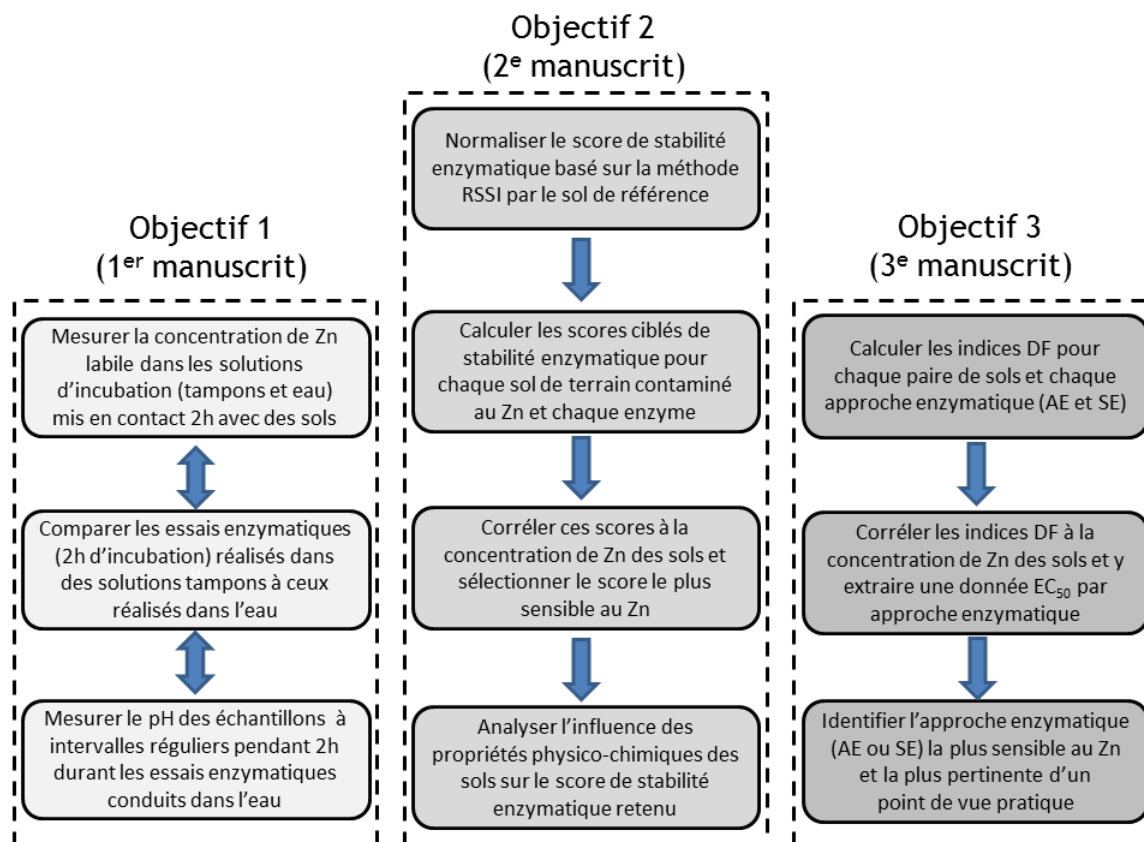


Figure 2.4-2 : Les étapes méthodologiques impliquées derrière chaque objectif spécifique du projet de doctorat. Les blocs et les flèches à simple pointe sont séquentiels, alors que les flèches à double pointe indiquent que les étapes impliquées ont été réalisées en parallèle.

### **CHAPITRE 3. PREMIER MANUSCRIT: METAL TOXICITY ASSESSMENT IN SOILS USING ENZYMATIC ACTIVITY: CAN WATER BE USED AS A SURROGATE BUFFER?**

#### **3.1. Présentation du premier manuscrit**

Ce premier manuscrit constitue une étape préliminaire essentielle pour l'élaboration du design expérimental du projet global. Les essais enzymatiques standards utilisent des conditions expérimentales spécifiques à l'enzyme testée (ex : température, substrat en excès, pH, etc.) afin de générer des 'potentiels' enzymatiques. Or, les solutions tampons utilisées pour fixer le pH durant les essais se situent parfois à des valeurs éloignées du pH du sol testé, ce qui pourrait altérer l'équilibre chimique du sol, changer la spéciation métallique et ainsi affecter l'effet toxique du métal sur l'activité enzymatique. Pour pallier à cette inquiétude, certains auteurs ont conduit leurs essais dans de l'eau au lieu du tampon. Bien que cette alternative s'approche des conditions *in situ* des essais enzymatiques, aucune étude n'a présenté des résultats confirmant que le pH de ces essais demeurerait constant durant toute la période d'incubation enzymatique. Ce manuscrit a donc étudié 1) l'effet du tampon sur la spéciation du Zn, 2) la possible fluctuation du pH durant les essais conduits dans l'eau et 3) la comparaison des essais enzymatiques conduits dans un tampon vs ceux conduits dans l'eau. L'activité de quatre enzymes (arylsulfatase, protéase, uréase et phosphatase acide) a donc été mesurée dans 10 sols contaminés au Zn en utilisant le tampon spécifique à l'enzyme testé et de l'eau en parallèle comme substitut au tampon. Les résultats de cette étude ont montré que 1) à l'exception d'un tampon de l'arylsulfatase, les tampons et l'eau ne changent pas la concentration de Zn labile dans les sols, 2) la légère fluctuation de pH observée lors des essais conduits dans l'eau est aussi observée dans les essais conduits dans les tampons et 3) à l'exception de l'uréase ayant un tampon à pH 10, les essais enzymatiques conduits dans l'eau sont similaires à ceux conduits dans le tampon. Ces résultats ont soulignées deux éléments importants : les tampons fixant le pH à des valeurs hors de la plage des sols sont à éviter (comme le tampon pH 10 de l'uréase) et l'eau peut être utilisée comme substitut aux tampons sans faire fluctuer significativement le pH des essais.

### **3.2. Abstract**

Ecotoxicological tests based on soil enzyme activity are widely used to assess the terrestrial ecotoxicology of metals in soils. However, several standard enzymatic methods use buffers that may alter the chemical pseudoequilibrium of soils and affect metal speciation, and, in turn, the metal effects on enzymes and enzyme kinetics. Researchers have suggested the use of H<sub>2</sub>O as a solvent rather than chemical buffers, but opponents are concerned about pH fluctuations during incubation and the resulting difficulty in comparing enzymatic studies. Enzyme assays were conducted on 10 pairs of Zn-contaminated soils to evaluate 1) the buffer effect on Zn lability 2) the pH fluctuation during enzymatic assays conducted in water and 3) the comparison of enzymatic results obtained using chemical buffers versus water. Four standard enzymatic methods covering the major biogeochemical cycles were targeted: arylsulfatase (acetate pH 5.8), urease (borate pH 10), acid phosphatase (modified universal buffer pH 6.5) and protease (trishydroxymethyl-aminomethane or TRIS pH 8.1). Furthermore, deionized water was tested in parallel as a surrogate solvent for these four methods. With the exception of the acetate buffer, the tested solvents did not significantly change the labile Zn concentration in the soil samples. The pH slightly fluctuated by +0.57 pH unit, corresponding to the intrinsic variability of soils. Enzymatic methods using buffers showed similar results compared to those using water, except for urease. These observations suggest that enzymatic methods setting alkaline conditions should be used with caution and that H<sub>2</sub>O could be used as surrogate solvent in this context.

### **3.3. Introduction**

The ecotoxicological assessment of metal-contaminated field-collected soils based on the estimated aggregated activity of several soil enzymes appears to be a suitable approach to develop routine terrestrial ecotoxicological tests (Epelde et al., 2008). Soil enzymatic activity (EA) reflects the rate-limiting step of biogeochemical decomposition required for microbial processes and is reproducible, affordable and easy to execute (German et al., 2011). Aggregating the results of many enzyme activities covering the C, P, N, and S cycles yields unique quantitative indices of soil functional diversity that could be used as bioindicators for soil health and metal toxicity (Bastida et al., 2008). For example, an assessment of the functional diversity of metal-contaminated soils using a modified Shannon's diversity index adapted for soil enzymes

(acid and alkaline phosphatase, urease, arylsulfatase and  $\beta$ -glucosidase) showed that the presence of metal significantly affects the index (Epelde et al., 2008). Sunray plots were also used as schematic representations of enzymatic activities in metal-contaminated soils (dehydrogenase, urease, acid and alkaline phosphatase, arylsulfatase and  $\beta$ -glucosidase) compared to an uncontaminated soil (Hinojosa et al., 2004b; Bastida et al., 2008). Biochemical analyses of metal-contaminated field-collected soils constitute a powerful approach to integrate the *in situ* partitioning of trace elements, thus considering metal speciation and bioavailability at pseudoequilibrium—two critical concepts for the assessment of metal toxicity in ecosystem studies (Sauvé, 2001). The labile (reactive) and free metal concentrations are the most widely-accepted metal fractions estimating metal bioavailability. The labile metal in the soil solution includes the free metal and metal ion-pair (mainly inorganic but also some organic ligands) showing a rapid dissociation association kinetics (Nolan et al., 2005).

Most of the soil enzymatic activity measurement methods recommend running assays in soils using optimal parameters such as pH and temperature in order to measure maximum potential activity (Dick, 2011). This procedure is widely used since it makes it possible to compare the enzymatic results of several studies and ensures reproducible assay conditions. The choice of buffer in routine operational protocols depends on several factors, including the buffering capacity of the enzyme's optimal pH value and the absence of buffer inhibition or interference with the enzyme or soil component (Tabatabai, 1994).

Soil enzymatic activity assessments were also conducted in buffer at a pH value close to the actual soil pH value, generating non-optimal but more realistic *in situ* results (Sinsabaugh et al., 2000; Yavitt et al., 2004; Li et al., 2009). Alternatively, soil enzyme activity was measured in equivalent volumes of H<sub>2</sub>O instead of buffer to better assess enzyme activities under field conditions (Kandeler & Gerber, 1988; Kandeler et al., 1996; Schinner et al., 1996; Caldwell et al., 1999; Taylor et al., 2002; Chaperon & Sauvé, 2007; Dussault et al., 2008; Chaer et al., 2009b). This approach has been criticized mainly because the enzyme assays conducted in H<sub>2</sub>O could be less reproducible due to possible pH fluctuations occurring during the enzymatic assay. Indeed, these pH fluctuations may alter the affinity of the enzymes for given substrates as well as the solubility of the enzymes, substrates and cofactors, thus modifying the kinetics of pH-dependent enzymatic reactions (Tabatabai & Dick, 2002; Turner, 2010).

However, the use of a single pH optimal value for a specific enzyme activity seems elusive because the optimal soil enzyme pH depends on the tested soils (Malcolm, 1983; Turner, 2010), and specific activities (e.g. phosphomonoesterase,  $\beta$ -glucosidase) may have different optima. For example, the urease pH ranges between 6-7 and 9-10 depending on the tested soils, suggesting that the use of a single pH buffer is questionable when a potential EA is intended (Alef & Nannipieri, 1995). Moreover, studies comparing soil enzymatic activity in buffer or H<sub>2</sub>O have not resulted in clear trends or significant pH fluctuations in unbuffered soil enzyme assays since they were carried out using few soils (Ross, 1987; Kandeler & Gerber, 1988; Taylor et al., 2002).

Methods measuring soil enzyme activity have been set up using uncontaminated soils. When using the soil enzyme activity for the ecotoxicological assessment of metal contaminated soils, the use of buffered assays may modify the metal speciation and interactions between metal species with enzymes and substrates (Tabatabai & Dick, 2002; Chaperon & Sauvé, 2007). In such cases, enzymatic results are not representative of the *in situ* speciation and potentially inhibitory effects of metals. Furthermore, the chemical composition and buffer concentration could be suitable for some soils but inadequate for others because the chemical pool of a soil-buffer-metal combination may vary significantly between soils, unequally affecting the kinetics of the enzymatic reaction (Speir & Ross, 2002). To date, such considerations remain theoretical because, to the authors' knowledge, no study has analyzed the effect of chemical buffers on soil solution chemistry and metal speciation and lability.

The overall aim of this study was to evaluate the possibility of using water instead of chemical buffers as a solvent when determining the EA in metal-contaminated field-collected soils. The specific objectives of this study were to assess: (i) the effect of buffers on soil metal speciation using field-collected non-spiked soils, (ii) the pH fluctuation of soil samples during enzymatic assays conducted in H<sub>2</sub>O and (iii) the correlation or divergence between the enzymatic assays conducted in buffers compared to those conducted in H<sub>2</sub>O. Zinc was chosen for this study because several monometallic contaminated field-collected soils of various Zn concentrations were available and also because Zn is a co-factor of several soil hydrolytic enzymes with inhibitory effects at higher concentrations (Smolders et al., 2003).

### 3.4. Material and Methods

#### 3.4.1. Soil sampling and physicochemical characterization

Zn-contaminated top soils (0-15cm) from Québec (Canada) were sampled under galvanized pylons and sieved in the field to  $< 2\text{mm}$ . Fifteen pairs of soils, in each case a contaminated soil and an uncontaminated reference soil (with similar soil characteristics), were sampled on different sites in a 300-km radius around Montréal to create a pool of field soils available for subsequent analyses. The contaminated soil was sampled in the center of the soil surface under the pylon, and the reference soil was sampled at  $25 \pm 5$  m from the pylon. Visual inspection (texture, color) was done in the field in order to sample a reference soil with physicochemical properties similar to those of contaminated soil. Laboratory analyses were carried out to select the 10 pairs with the closest physicochemical properties within each pair (except for total Zn concentration) prior to the biological analyses (see Table 3.5-1). Field-moist sieved soils were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  in an inert plastic covered box.

The soil pH was measured with a pH-meter and glass electrode (Accumet, model 25) in the supernatant of a soil slurry prepared by shaking 10g of soil and 20ml of 0.01M  $\text{KNO}_3$  solution (extra pure grade) with a vortex mixer for 1 min and waiting 1 hour for the soil suspension to settle (Carter & Gregorich, 2008; Stephan et al., 2008). The buffer capacity was analyzed through pH measurement after the addition of solutions of increasing nitric acid concentrations (Zagury, 1997). The total carbon was analyzed using the combustion method (CEAEQ, 2006) and the total organic carbon (TOC) using the Walkley-Black wet-acid oxidation method with dichromate solution (Carter & Gregorich, 2008). The texture (% sand, % silt, % clay) was determined by hydrometric analysis preceded by the pre-treatment of soil organic matter and Fe and Al sesquioxides (Carter & Gregorich, 2008). Total metal was extracted by total digestion: 1g of sieved-ground dry soil was mixed with 15ml  $\text{HNO}_3$  (70% v/v, environmental grade) and gently boiled on a heating plate for 60 min in a Teflon covered beaker. This step was repeated. When the mixture was cooled, 20ml  $\text{HClO}_4$  (70% v/v, environmental grade) and 1ml HF (48% v/v, environmental grade) were added to the beaker, and the soil digest was gently boiled on a heating plate until the acid mixture became clear and white fumes appeared. All the soil samples, extractions and analyses were done in triplicate, except for the texture analysis (only one sample

per soil). The total metal content (Al, Mn, Co, Ba, Ni, Cu, Pb, Cd, Zn) of the diluted filtrate was then analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Varian ICP-820M, Montréal, QC Canada) (Martin et al., 1994). The total concentrations for Al, Mn, Co, Ba, Ni, Cu, Pb and Cd were at the geological background levels, meaning that all the soils were only contaminated by Zn.

#### 3.4.2. Labile Zn concentration based on the solvent

Labile Zn concentration was measured in soil extraction experiments using deionized water ( $H_2O$ ) or buffers used for the enzyme activities in order to determine eventual changes in Zn speciation based on the solvent used during the enzymatic assay. Buffers with various pH and chemical compositions associated with four soil hydrolases involved in nutrient biogeochemical cycles were used in this study: buffers related to arylsulfatase (acetate pH 5.8), acid phosphatase (modified universal buffer MUB pH 6.5), urease (borate pH 10) and protease (trishydroxymethyl-aminomethane TRIS pH 8.1) and deionized water as a solvent surrogate were used for each soil tested. The ten selected Zn-contaminated field soils were analyzed; reference soils were also tested but all their labile Zn concentrations were under the detection limit of the voltammetric method described below.

Soil samples in a 1:4 soil-solvent ratio were mixed for 2 h (same soil-solvent ratio and incubation time as the enzymatic assays). The supernatant of the soil slurry was then filtered, and extra-pure grade  $KNO_3$  solution was added to yield the minimal and normalized electrolytic 0.01M soil sample concentration required for the voltammetric measurements (Stephan et al., 2008). The labile Zn concentration was then analyzed by square wave anodic stripping voltammetry (SW-ASV, polarographic stand VA663 of Metrohm and voltammeter 100B of Bioanalytical System, city of Québec, QC, Canada) immediately after filtration.

#### 3.4.3. Enzymatic assays and pH monitoring

The ten pairs of field-collected soils were pre-incubated at room temperature (22°C) at 60% of the water holding capacity 4 d prior to the analyses in order to stabilize the microbial activity. Short-term hydrolase assays (arylsulfatase, acid phosphatase, urease and protease) were selected for limiting enzyme synthesis during the incubation and for assessing abiotic extracellular EA

(Nannipieri et al., 2002). Thus all enzyme assay incubations were for 2 h in order to standardize the incubation time and facilitate experimental design. Arylsulfatase activity was measured by mixing 1g of soil with 4 ml of 0.5 M acetate buffer pH 5.8 and 1 ml of 20mM potassium-p-nitrophenylsulfate as substrate and the same amount of soil was mixed with 4 ml of modified universal buffer (MUB) pH 6.5 and 1 ml of 11.5 mM disodium-p-nitrophenylphosphate as substrate for the acid phosphatase activity (Schinner et al., 1996). It should be noted that the recorded substrate concentration for the phosphatase assay in this soil methods book (Methods in Soil Biology) is 115mM, but in fact, the real concentration is 11.5mM. Indeed, the phosphatase standard operational protocol (SOP) recommends dissolving 4.268g of disodium 4-nitrophenyl-phosphate in 1000ml of buffer or H<sub>2</sub>O. Knowing that the molecular mass of disodium 4-nitrophenyl-phosphate is 371.14g·mol<sup>-1</sup> (Sigma N4645), the molarity of the substrate is 11.5mM. For phosphatase assay (and all other enzyme assays) in this study, the original SOPs, substrate and solution recipes of the book Methods in Soil Biology were used (Schinner et al., 1996). The substrate concentration (11.5mM) used in this book ensures the enzyme saturation of short-term phosphatase assays and was likely sufficient to maintain the zero-order kinetics. Higher concentrations should not significantly change the outcome, since phosphatase activity K<sub>M</sub> values of various soils were reported to be in the 1.11-3.40 mM range (Eivazi & Tabatabai, 1977).

The soil slurry of these two enzymes was incubated for 2 h at 37°C, and the enzymatic reaction was stopped by adding 1ml of 0.5M CaCl<sub>2</sub> and 4ml of 0.5M NaOH. The soil slurry was centrifuged at 20 000 g for 5 min, and the supernatant was quantitatively transferred to a microplate well. The absorbance of these two enzymes was read at 420 nm against the blank with a multifunction microplate reader (GENios, Tecan, Montréal, QC, Canada) and then converted in p-nitrophenol concentration by the standard curve prepared with different standard solutions varying between 0 and 30µgml<sup>-1</sup> (Schinner et al., 1996).

Urease activity was measured by mixing 1g of soil with 4ml of 0.1M borate buffer pH10 and 0.5ml of 720mMurea as substrate. The soil slurries were incubated for 2 h at 37°C. At the end of the incubation, soil samples were mixed with 6ml of 1M KCl for 30 min. The soil slurry was centrifuged at 20 000 g for 5 min, and the supernatant was quantitatively transferred in a microplate, where reagents (mixture of sodium nitroferricyanide and sodium dichloroisocyanurate) were added to color the samples. The absorbance was read at 685 nm



against the blank and converted into ammonium concentration by the standard curve prepared with different standard solutions varying between 0 and  $25\mu\text{gNH}_4^+\text{-N}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Schinner et al., 1996).

Protease activity was measured by mixing 1g of soil with 5ml of 0.05M TRIS buffer pH8.1 and 5ml of 2% w/v casein as substrate. The soil samples were incubated for 2h at 50°C. At the end of the incubation, soil samples were mixed with 5ml of 0.92M  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCA). The soil slurry was centrifuged at 20 000 g for 5 min, and the supernatant was quantitatively transferred to a microplate, where reactants (mixture of complexed alkali reagent and Folin Ciocalteu phenol reagent) were added to color the samples. The absorbance was read at 700 nm against the blank and converted in tyrosine concentration by the standard curve prepared with different standard solutions varying between 0 and  $100\mu\text{g tyrosine ml}^{-1}$  (Schinner et al., 1996).

The enzymatic activities of each soil sample were analyzed in triplicate in addition to two controls (soil samples for which the substrate was added only after the 2 h incubation). All four enzymatic assays were also conducted in parallel, in  $\text{H}_2\text{O}$  as a surrogate solvent instead of buffer, on the pairs of field-collected soils. The soil pH of the enzymatic assays conducted in water was also monitored for 2 h at 20-min intervals in order to verify whether the pH fluctuates when enzymatic assays are conducted in water. The ten Zn-contaminated soils were pH-monitored for each of the four enzyme activities conducted in  $\text{H}_2\text{O}$ . Preliminary statistical analysis showed that pH monitored in reference soils was not significantly different from that observed in their coupled Zn-contaminated soils.

#### 3.4.4. Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using SAS Institute Inc.'s JMP 9.0.0 software. Two independent Student t-tests were carried out for each soil pair and each physicochemical analysis (except the soil texture) in order to verify whether the contaminated and reference soils had similar physicochemical properties. Analyses of variance (ANOVA) and multiple comparison Tukey-HSD tests were done to determine significant differences among mean values of labile zinc concentration in samples placed in contact with different solvents. Bivariate linear regressions were analyzed to detect significant relationships among the soil sample pH values and incubation time. When significant regressions were obtained, regression slopes were recorded. Bivariate linear regressions were also analyzed for each enzyme to determine the significant

relationships among the EA conducted with and without buffer. Based on these relationships, two key statistical key parameters, the coefficient of determination  $R^2$  and the slope of the regression, were extracted. An analysis of covariance (ANCOVA) was also conducted between the two continuous variables and the contamination ID (contaminated or reference soil) as a nominal variable in order to verify whether the total zinc content could influence these regressions. Significant levels  $\alpha$  were set at  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  and  $***P<0.001$ . Statistical postulates (normality of residues and homogeneity of variance) were tested prior to the statistical parametric analyses.

### 3.5. Results

#### 3.5.1. Physicochemical properties of field-collected soils

The physicochemical properties of the 10 pairs of soils are reported in Table 3.5-1. The selected pairs of field soils cover a wide range of physicochemical properties, which may influence metal speciation, pH fluctuation and EA. The field-collected soils were acidic to neutral, with a pH varying between 4.55 and 7.09 and a mean pH of 6.02. The buffer capacity varied between 2.3 and 15.6  $\text{cmol H}^+\text{kg}^{-1}\text{pH unit}^{-1}$  (except for soil Joliette R) with an average  $\text{BC}=7.6 \text{ cmol H}^+\text{kg}^{-1}\text{pH unit}^{-1}$ . The TOC varied between 14.1 and 140  $\text{g kg}^{-1}$  of dry soil, with an average of 45.5  $\text{g C kg}^{-1}$  of dry soil. The texture varied between sand and clayey loam. The total Zn concentration varied between 64 and 3 990  $\text{mg kg}^{-1}$  with an average of 891  $\text{mg kg}^{-1}$ . Some physicochemical properties were slightly but significantly different within pairs of soils, which is a drawback of analyzing field-collected soils. However, this consideration had no impact on the study objectives, and the t-test statistics are given as information only.

Table 3.5-1: Physicochemical properties of Zn-contaminated field soils used to study the effect of buffers on metal speciation

Soil ID (no, city, status) <sup>a</sup>			pH	BC <sup>b</sup> cmol H <sup>+</sup> /kg ds <sup>d</sup> /pH unit	TOC <sup>c</sup> g/kg ds <sup>d</sup>	Sand %	Silt %	Clay %	Total Zn content mg/kg ds <sup>d</sup>
1	Rapide Blanc	C	4.73 ± 0.06	7.6 ± 5.1	139.7 ± 5.1	72	28	0	795 ± 47
	Rapide Blanc	R	4.55 ± 0.02	2.3 ± 0.5	23.6 ± 0.5	89	11	0	94 ± 10
	t-test	-	**	NS	***		NA		***
2	Pointe-aux-Trembles	C	6.46 ± 0.08	3.0 ± 1.4	35.4 ± 1.4	52	33	15	1423 ± 16
	Pointe-aux-Trembles	R	6.45 ± 0.08	2.7 ± 0.2	35.8 ± 0.2	39	32	29	59 ± 2
	t-test		NS	NS	NS		NA		***
3	Mascouche 1	C	4.58 ± 0.10	7.4 ± 3.9	39.8 ± 3.9	44	30	26	2915 ± 53
	Mascouche 1	R	5.96 ± 0.02	4.0 ± 1.2	22.1 ± 1.2	40	35	25	145 ± 41
	t-test		***	NS	***		NA		***
4	Laval	C	6.93 ± 0.01	10.2 ± 5.0	27.7 ± 5.0	61	33	6	717 ± 20
	Laval	R	7.09 ± 0.03	4.3 ± 1.2	33.7 ± 0.2	58	24	18	99 ± 7
	t-test		***	NS	NS		NA		***
5	Laprairie	C	6.77 ± 0.06	5.7 ± 0.2	37.4 ± 0.2	57	33	10	308 ± 11
	Laprairie	R	6.67 ± 0.04	3.6 ± 0.2	31.8 ± 0.2	58	28	14	215 ± 15
	t-test		NS	***	**		NA		***
6	Joliette	C	6.54 ± 0.02	13.8 ± 1.4	94.9 ± 1.4	94	6	0	3988 ± 70
	Joliette	R	6.65 ± 0.02	35.3 ± 5.9	103.3 ± 5.9	98	2	0	669 ± 66
	t-test		**	**	***		NA		***
7	Mascouche 2	C	5.45 ± 0.07	3.5 ± 0.5	36.5 ± 0.5	94	6	0	1305 ± 41
	Mascouche 2	R	6.19 ± 0.07	1.9 ± 0.1	17.3 ± 0.1	88	11	1	79 ± 6
	t-test		***	**	***		NA		***
8	St-Bruno	C	6.23 ± 0.06	15.6 ± 1.3	59.4 ± 1.3	40	46	14	1407 ± 51
	St-Bruno	R	7.01 ± 0.03	3.5 ± 1.2	15.3 ± 0.2	36	54	10	123 ± 8
	t-test		***	***	***		NA		***
9	St-Sauveur	C	5.29 ± 0.12	2.3 ± 0.2	14.1 ± 0.1	87	13	0	403 ± 12
	St-Sauveur	R	4.55 ± 0.09	9.1 ± 4.2	22.0 ± 0.2	82	18	0	64 ± 5
	t-test		***	***	***		NA		***
10	Montréal	C	5.29 ± 0.01	2.3 ± 0.9	14.1 ± 4.9	58	41	1	2582 ± 88
	Montréal	R	4.55 ± 0.05	9.1 ± 0.4	22.0 ± 0.3	43	50	7	247 ± 8
	t-test		**	NS	**		NA		***

<sup>a</sup> Status: C=Zn-contaminated, R=reference

<sup>b</sup> BC= Buffer capacity

<sup>c</sup> TOC = Total organic carbon

<sup>d</sup> ds= Dry soil basis

<sup>e</sup> NS = Not significant, NA = Not applicable

### 3.5.2. Labile Zn concentration based on solvent

The complex chemical composition of the MUB buffer used for acid phosphatase interfered with the ASV instrumentation and generated an unclear labile Zn signal in the voltammeter. Therefore, this buffer did not generate relevant results and was omitted from the speciation part of the study. Results of labile Zn concentrations measured in acetate buffer (pH 5.8) were significantly higher – up to two orders of magnitude for six soils tested – than those in the other solvents (Table 3.5-1 and Figure 3.5-1). Acetate buffer was therefore excluded from this figure in order to better visualize the labile Zn statistical results obtained by analyzing borate (pH 10), TRIS (pH 8.1) and H<sub>2</sub>O as solvents (Figure 3.5-2). No significant differences were detected in four soils (Joliette, Laprairie, Laval and PAT sites). Five soils induced slight (i.e. less than one order of magnitude labile Zn level) but significant labile Zn differences (Mascouche 2, Montreal, Rapide Blanc, St-Bruno and St-Sauveur). One soil (Mascouche 1) showed a contrasting high labile Zn concentration in H<sub>2</sub>O compared to the borate and TRIS buffers.

Table 3.5-2: Labile zinc concentration (mg Zn kg<sup>-1</sup> dry soil) measured in ten Zn-contaminated soils submitted to a 2-hr contact time with different solvents (mean ± standard deviation, triplicate).

Soil ID	Acetate pH5.8			Borate pH10			TRIS pH8.1			Water		
Joliette	259.37	±	6.55	3.23	±	0.32	3.37	±	0.15	2.97	±	0.21
Laprairie	9.90	±	1.08	< LOD			< LOD			< LOD		
Laval	20.05	±	2.51	< LOD			< LOD			< LOD		
Mascouche 1	409.06	±	114.31	< LOD			8.21	±	1.51	85.62	±	8.03
Mascouche 2	34.99	±	0.89	< LOD			< LOD			13.14	±	5.72
Montreal	462.23	±	23.95	9.75	±	0.48	7.90	±	0.26	2.67	±	0.12
PAT	169.00	±	5.16	1.54	±	0.08	0.90	±	0.44	0.97	±	0.06
Rapide Blanc	55.70	±	2.38	1.36	±	0.74	3.00	±	0.23	1.88	±	0.50
St-Bruno	113.73	±	1.04	2.98	±	0.05	2.40	±	0.53	3.60	±	0.61
St-Sauveur	15.29	±	1.04	< LOD			< LOD			6.41	±	0.97

<sup>a</sup> LOD: Limit Of Detection

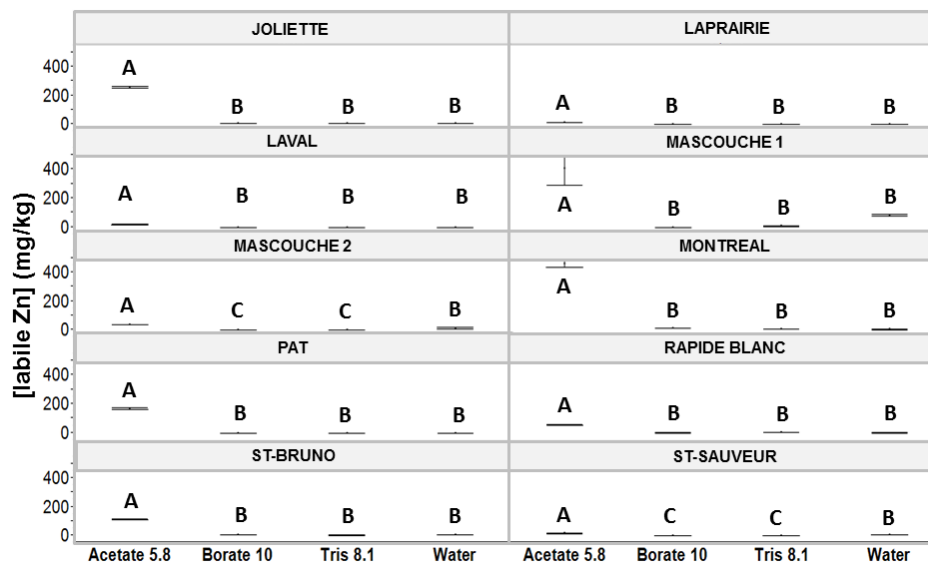


Figure 3.5-1 : Tukey-HSD mean separation test results of the Zn labile concentrations ( $\text{mg Zn kg}^{-1}$  dry soil) measured in ten Zn-contaminated soils submitted to a 2-hr contact time with four different solvents (except MUB buffer, see section 3.2 for more details).

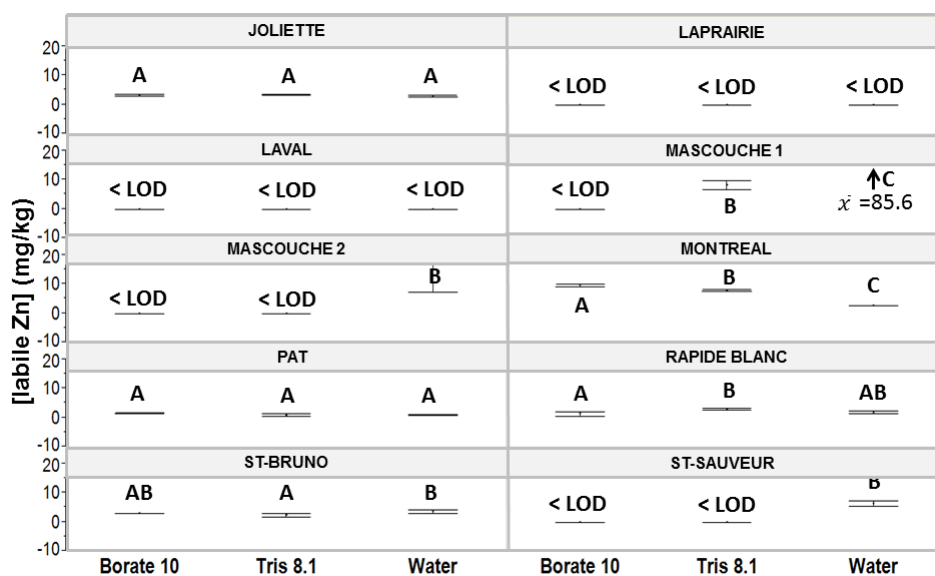


Figure 3.5-2 : Tukey-HSD mean separation test results of the labile Zn concentration ( $\text{mg Zn kg}^{-1}$  dry soil) measured in ten Zn-contaminated soils submitted to a 2-hr contact time with different solvents without the acetate buffer (same data as in Figure 1 without acetate buffer for more clarity).

### 3.5.3. pH monitoring during enzymatic assays in H<sub>2</sub>O

The slight but significant pH variations during enzymatic assays conducted in H<sub>2</sub>O for some combinations of enzymes and Zn-contaminated soils, as calculated by the slope of the linear regression of the pH of the enzymatic mixture samples versus incubation time, are reported in Table 3.5-3. The largest pH variation was observed in the Laprairie soil with an average buffering capacity (increase of 0.57 pH unit after 2 h). Contrary to what was expected, soils with lower buffer capacity did not show large pH fluctuations and no trend could be observed between pH fluctuations and soil buffer capacity.

Table 3.5-3: Variation of pH values for enzyme assays conducted in water. The ten Zn-contaminated soils are listed by increasing buffer capacity. The plus (+) and the minus (–) signs represent respectively a pH increase or decrease after a 2-h incubation related to the initial pH value of the soil-water slurries before the incubation

Soil ID	Buffer Capacity	Arylsulfatase	Phosphatase	Protease	Urease
	cmol H <sup>+</sup> /kg ds <sup>a</sup> / pH unit				
Montreal	2.3	NS <sup>b</sup>	+0.217/2hrs *	NS	NS
St-Sauveur	2.3	+0.190/2hrs*	+0.099/2hrs **	NS	+0.251/2hrs ***
PAT	3.0	NS	+0.090/2hrs **	NS	+0.312/2hrs ***
Mascouche 2	3.5	NS	NS	NS	NS
Laprairie	5.7	NS	-0.216/2hrs **	+0.570/2hrs **	NS
Mascouche 1	7.4	NS	NS	NS	NS
Rapide Blanc	7.6	-0.162/2hrs **	+0.246/2hrs *	-0.518/2hrs **	NS
Laval	10.2	-0.048/2hrs **	-0.200/2hrs *	+0.143/2hrs *	+0.178/2hrs **
Joliette	13.8	-0.237/2hrs *	NS	NS	+0.230/2hrs *
St-Bruno	15.6	NS	NS	NS	+0.366/2hrs ***

<sup>a</sup> DS= Dry Soil basis

<sup>b</sup> NS= Not significant

<sup>c</sup> Significant levels  $\alpha$ : \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001

### 3.5.4. Enzymatic assays conducted in buffers compared to H<sub>2</sub>O

The comparison of the EA conducted in buffers and those conducted in water showed strong and significant linear correlations. For the 20 field-collected soils (combined Zn-contaminated and reference soils), the coefficients of determination for the linear regression ( $y=EA_{\text{buffer}}$  and  $x=EA_{\text{H}_2\text{O}}$ ) of almost all the enzymes were greater than  $R^2=0.89$ , except for urease, which showed a weaker linear regression ( $R^2=0.66$ ). The slope of the regressions of acid phosphatase and

arylsulfatase was close to 1 (Table 3.5-4), meaning that enzymatic results in buffers and water were similar. However, the EA of protease conducted in TRIS pH8.1 was considerably higher than those conducted in water (slope of the regression of  $EA_{\text{buffer}}$  related to  $EA_{\text{H}_2\text{O}} = 1.41^{***}$ , see Table 3.5-4), and the EA of urease was considerably higher in water than in borate pH 10 buffer (slope of the regression of  $EA_{\text{buffer}}$  related to  $EA_{\text{H}_2\text{O}} = 0.36^{***}$ , see Table 3.5-4). The analysis of covariance showed that the total Zn content had no significant effect on the coefficients of determination, and the slopes of the linear regressions remained the same for the four enzymes tested.

Table 3.5-4: Statistical summary of linear regressions of enzymatic assays conducted in buffers ( $EA_B^a$ ) related to enzymatic assays conducted in water ( $EA_W^b$ ) for each enzyme

Enzyme	Buffer	Equation	$R^2$ <sup>c</sup>	Highest EA in
Arylsulfatase	0.5M Acetate pH 5.8	$EA_B = 61.1 + 1.12EA_W^{***}$	0.89	Buffer
Protease	0.05M TRIS pH 8.1	$EA_B = -32.1 + 1.41EA_W^{***}$	0.92	Buffer
Acid Phosphatase	MUB pH 6.5	$EA_B = -1.56 + 0.81EA_W^{***}$	0.97	Water
Urease	0.1M Borate pH 10	$EA_B = 12.67 + 0.36EA_W^{***}$	0.66	Water

<sup>a</sup>  $EA_B$  = Enzymatic activity conducted in buffer

<sup>b</sup>  $EA_W$  = Enzymatic activity conducted in water

<sup>c</sup>  $R^2$  = Coefficient of determination

<sup>d</sup> Significant levels  $\alpha$ : \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$

## 3.6. Discussion

### 3.6.1. Labile Zn concentration based on solvent

Contrary to the hypothesis, TRIS (pH8.1) and borate (pH10) buffers did not considerably change the lability of Zn in the soil samples after a 2-h contact time as compared to  $H_2O$ , with the exception of the Mascouche 1 soil. The detected labile Zn concentrations were in line with those found by Stephan et al. (2008), who showed that for 60 field-collected soils containing 11 to 3 612 mg total  $Zn\text{kg}^{-1}$ , the labile Zn concentrations varied between 0 and 3 mg labile  $Zn\text{kg}^{-1}$ . Since labile Zn concentrations in the borate buffer were similar to those in  $H_2O$ , the divergence of urease activity in buffered and unbuffered assays (Table 3.5-4) could not be explained by variations in the labile Zn concentrations after a 2-h contact time.

However, the labile Zn concentration measured in the soil mixture extracted from the acetate buffer was 10 to 50 times higher than those measured in other soil solutions. It is unlikely that the pH of the slightly acidic acetate solution (pH 5.8) solely explains these high labile Zn concentrations since the soils extracted with H<sub>2</sub>O were also slightly acidic (soil pH<sub>KNO<sub>3</sub></sub> 5.29 - 6.54). The increased lability of Zn was likely caused by the complexation capacity of acetate towards Zn in solution, generating a species pool of about 20% Zn<sup>2+</sup>, 50% ZnAc<sup>+</sup> and 20% ZnAc<sub>2(aq)</sub> (Borg & Liu, 2010). The acetate solution also efficiently removed and transferred Zn<sup>2+</sup> from clay particulates to the soil solution (Stathi et al., 2009). Therefore, the available Zn concentrations in soil slurries during enzymatic assays conducted in the acetate buffer were much higher as compared to the assays conducted in H<sub>2</sub>O. Nonetheless, arylsulfatase results conducted in the acetate buffer are comparable to those conducted in water (slope=1.12, close to the y=x relation, see Table 3.5-4), suggesting that the enzymatic acetate buffered assays were not significantly affected by the increase in Zn bioavailability after 2 h.

### 3.6.2. pH fluctuation during enzymatic assays in H<sub>2</sub>O

The pH fluctuations observed during assays conducted in water are in line with those reported by Caldwell et al. (1999) who measured phosphatase and β-glucosidase activity in deionized H<sub>2</sub>O and reported that the pH value of the soil slurries varied by less than 0.1 pH unit after a 1h-incubation. Qin and Cabral (1994) showed that the urease assays conducted in aqueous samples without buffer could increase the solution pH value by 3 units after 2 h, far more than the maximum pH fluctuation measured in our study (+0.57 pH unit after a 2h incubation for protease assay). This observation suggests that the inherent buffer capacity of soils can efficiently stabilize pH during short-term enzymatic assays conducted in H<sub>2</sub>O. Furthermore, a study showed that the pH of five different soil samples buffered by MUB during invertase assays fluctuated by up to +0.9 pH unit, which is higher than 0.57 pH unit (Ross, 1987). Hence, slight pH fluctuations seem to be accounted for in the intrinsic variability of the soil enzymes in solution and are not prevented by the use of buffers.

The source of the soil enzymes raises a question regarding the use of one single pH buffer for EA. The highly diverse soil microbial communities have the potential to synthesize enzymes having different pH optima which all contribute to the total activity of specific enzymes, resulting in a bell-shaped interval of pH optima rather than one narrow peak. For example, Turner (2010)



showed that optimal pH of  $\beta$ -glucosidase, arylsulfatase and other enzymes using fluorogenic substrates varied between 1 and 3 pH unit. Another study showed that the pH optima of acid phosphatase, assayed with para-nitrophenyl phosphate, fluctuated within a range of 4.5-6.5 pH unit in different acidic soils (Trasar-Cepeda & Gil-Sotres, 1988). Furthermore, acid to neutral-alkaline pH optima have been reported for some enzymes (phosphatase, lipase and protease) depending on the ageing/weathering/native pH history of the soil, leading in some cases to a biphasic curve of enzymatic activity vs pH (Kamimura & Hayano, 2000; Caldwell, 2005). Kamimura & Hayano (2000) specified that although there are biphasic peaks for protease activity – with the largest occurring in the alkaline region – the acid-type soil proteases likely play a more important role in the nitrogen cycling of the tested acid soil (soil pH = 3.4) than the alkaline proteases. Overall, these findings underline our opinion that the standard enzymatic methods using a single optimal-pH buffer, especially when distant from the native soil pH value, should be viewed with caution when the aim of the study is to assess the *in situ* soil enzymatic activity.

### 3.6.3. Enzymatic assays conducted in buffers compared to H<sub>2</sub>O

Water is a suitable buffer surrogate for short-term enzymatic assays in metal-contaminated and uncontaminated soils. Indeed, pH fluctuations seem to be associated with the soils' intrinsic variability, and strong linear correlations were observed among buffered and unbuffered enzymatic assays for arylsulfatase, acid phosphatase and protease. These methods use buffers with a pH-value in or close to the natural pH range of soils (between pH=4.55 and pH=7.01). The correlations found in this study (Table 3.5-4) could therefore be used to convert and compare results between soil enzymatic studies in which the solvents differ. The metal-contaminated or uncontaminated status of the field-collected soils did not affect these correlations. It should be noted that water as solvent yielded higher enzymatic results for the acid phosphatase and the urease than did the buffers. Taylor et al. (2002) also compared the buffered and unbuffered EA of two different soils and showed that the acid phosphatase and arylsulfatase activities of the two soils were higher in water than in their MUB buffers (pH 4 and pH 5.8 respectively), whereas urease activity was higher only for one of the two soils. However, the coefficient of regression of urease was considerably lower than that of the other enzymes ( $R^2=0.66$ ), and the urease activities conducted in water were noticeably higher than those conducted in the borate buffer (slope=0.36). Statistical analyses were carried out in order to determine a physicochemical

explanation for these discrepancies, but no common soil property could be identified. It is not yet clear whether the pH of the buffer or its chemical composition has the greatest effect on the enzymatic divergences observed for the urease assays. The soil microbial community may produce various urease enzymes with different optimal pH closer to the native soil pH rather than the alkaline buffer pH imposed by the method, as hypothesized by Kamimura & Hayano (2000).

Qin and Cabral (1994, 2002) also reported that a low ionic environment is beneficial for the kinetics of the urease and that the urease activity decreases rapidly at pH greater than 7. Furthermore, it was reported that boric components could competitively inhibit urease activity (Mobley & Hausinger, 1989). However, the original method showed that the urease assay was truly optimal in the borate buffer at pH 10, even if the three soils tested has a soil pH varying between 5.2 and 5.4 (Kandeler & Gerber, 1988).

### **3.7. Conclusion**

Our results helped to elucidate the effects of buffers on the measured soil enzyme activity by reporting data on pH fluctuation and yielding a real comparison between various buffers and H<sub>2</sub>O. Moreover, our results contributed to a better use of soil enzyme activity for soil ecotoxicological assessment through a clear evaluation of the buffers on metal speciation. In developing ecotoxicological tests based on the EA of many metal-contaminated field-collected soils, it is hardly conceivable to first define the optimal pH for each soil, as suggested by Turner (2010). Our results show that H<sub>2</sub>O can be used for measuring EA in metal contaminated soils since EA in buffer or H<sub>2</sub>O behaves similarly. More research must be carried out to compare other *in situ* environmental conditions (temperature, substrate concentration, diffusion processes, etc.) and potential activity conducted using optimal enzymatic conditions for more insight into controversial laboratory conditions used in terrestrial enzymes studies.

## **CHAPITRE 4. DEUXIÈME MANUSCRIT: ENZYMATIC FUNCTIONAL STABILITY OF ZN-CONTAMINATED FIELD-COLLECTED SOILS: AN ECOTOXICOLOGICAL PERSPECTIVE**

### **4.1. Lien entre le premier manuscrit et les manuscrits subséquents**

Le premier manuscrit a éclairci un point crucial dans le design expérimental des essais enzymatiques en montrant que l'eau peut être utilisée comme solution d'incubation lors des essais enzymatiques sur des sols et que les tampons fixés à des pH hors de la plage de pH des sols sont à éviter. Les manuscrits subséquents sont donc basés uniquement sur les résultats enzymatiques conduits dans l'eau.

### **4.2. Présentation du deuxième manuscrit**

La stabilité fonctionnelle (SF) est un attribut de l'écosystème de plus en plus étudié en évaluation de santé des sols. Cependant, les scores de SF disponibles n'intègrent pas l'historique du site d'échantillonnage à l'intérieur des scores. Pour résoudre ces lacunes, trois nouveaux scores basés sur la méthode RSSI et normalisés par le site de référence ont été développés. Le but de ce manuscrit était de déterminer si ces scores décrivent mieux la toxicité du Zn des sols contaminés. Pour ce faire, 20 paires de sols (sol contaminé et son sol de référence non-contaminé) ont été échantillonnés, les fractions pertinentes de Zn ont été quantifiées et la stabilité de 4 enzymes (arylsulfatase, protéase, phosphatase et uréase) a été calculée. Les scores de stabilité enzymatique (nouveaux et existants) ont été corrélés aux différentes concentrations de Zn. Un des nouveaux scores appelé le RSSIb était corrélé ( $R^2 > 0,5$ ) à la concentration de Zn labile des sols pour 3 des 4 enzymes testées individuellement (arylsulfatase, phosphatase et uréase), alors que les autres scores étaient corrélés à seulement une enzyme variant selon le score étudié. Le RSSIb est donc le score qui décrit le mieux la toxicité du Zn des sols contaminés collectés sur le terrain. C'est par conséquent ce score qui a été utilisé pour la dernière portion du projet doctoral.

### **4.3. Abstract**

Functional stability (FS) is an ecosystem attribute that is increasingly promoted in soil health assessment. However, FS is currently assessed comparatively, and it is therefore impossible to generate toxicity parameters. Additionally, the FS scores in the literature do not consider site and contamination history within the score. To address these issues, three new FS scores adapted to an ecotoxicological context and based on the Relative Soil Stability Index (RSSI) method were developed. The aim of the study was then to determine the FS score(s) that best describe the toxicity of metal-contaminated field-collected soils. Twenty pairs of Zn-contaminated soils (contaminated and reference soils) were collected on the field, and their enzymatic FS (arylsulfatase, protease, phosphatase and urease) and metal fractions (total and bioavailable) were analyzed. New RSSI-based and existing FS scores were calculated for each enzyme and correlated to the Zn fractions. One of the new RSSI-based scores was well correlated with the bioavailable labile Zn concentration for the arylsulfatase, phosphatase and urease (coefficients of regression higher than 0.50). Furthermore, this FS score was not affected by the soil organic matter and depended little on other soil properties. Other FS scores were correlated to labile Zn for only one enzyme, which varied according to the score. The new RSSI-based score thus better attributed Zn toxicity to field-collected soils than other FS scores.

### **4.4. Introduction**

Microbial ecology research is at a tipping point at which ecosystem health and ecotoxicology are increasingly assessed by attributes, ecosystem services or ecologically relevant features rather than conventional biological indicators (Garbisu et al., 2011). Understanding how ecosystems respond when faced with additional stressors is an example of these attributes known as functional stability (FS) or engineering resilience (Griffiths & Philippot, 2013). In recent years, many authors have endorsed FS assessment as a holistic, timely and relevant approach to protect ecosystems facing simultaneous stressors (Shade et al., 2012; Pereira e Silva et al., 2013; Zell & Hubbart, 2013). Griffiths and Philippot (2013) recently described and supported this approach in a complete review, showing that over 40 soil studies based on FS assessment were published in the last decade. The soils were mostly pre-stressed by natural or anthropogenic stressors such as wild fire episodes, land management or contamination. Studies on pre-stressed ecosystems

constitute a particular field known as co-tolerance (Vinebrooke et al., 2004; Tobor-Kaplon et al., 2006b). One third of the studies recorded in the review of Griffiths and Philippot (2013) assessed the co-tolerance of pre-stressed metal contaminated soils through FS assessment, suggesting that an FS approach is praised and well-suited for studying multi-stressed and tolerant ecosystems.

FS results expression varies widely in the literature. For example, certain studies plotted and visually compared microbial response after the laboratory-controlled (LC) stressor (Philippot et al., 2008; Deng et al., 2009). However, a comparison of numerous graphics is neither convenient nor objective, since each soil has its own site history conferring various biological activity baselines that depend on physicochemical properties and background metal concentrations. To simplify and organize the data treatment, the FS information is often gathered in static spot-time scores right after (resistance score) and/or at a specific time following the LC stressor (resilience score) (Griffiths et al., 2000; Orwin & Wardle, 2004; Tobor-Kaplon et al., 2006a; Chaer et al., 2009a; Mertens et al., 2010; Epelde et al., 2012). Bécaert et al. (2006) innovated by considering the dynamic of the biological function after a heat stressor and developed the Relative Soil Stability Index (RSSI) method, the first time-integrated method. Zhang et al. (2010) followed this approach to propose a time-integrated resilience score similar to the RSSI score. Table 4.6-1 shows the equations for the FS scores that are currently available.

The RSSI method is particularly interesting in ecotoxicity assessment since it shows 2,4-D and copper toxicity in soil enzymes by a decrease in RSSI scores when soil is contaminated, considering that a high RSSI score implies high FS (Bécaert et al., 2006; Dussault et al., 2008). Furthermore, the RSSI method monitors the activity of various soil enzymes, thus providing many advantages: it gives insight into the main biogeochemical cycles, and soil enzymes are mainly produced by indigenous microbial community and are metal-sensitive, easily measurable, affordable and reproducible (Caldwell, 2005). Additionally, FS studies related to the biological activity of a microbial community may be more reliable than those related to microbial abundance or structural diversity. Indeed, these two last categories of microbial indicators may be modified by a stressor without affecting the overall functional integrity of the soil microbial community due to its high level of functional redundancy (Epelde et al., 2012). Moreover, the RSSI method uses 60°C heating as an LC stressor—a temperature slightly above the optimal temperature range of mesophile microbes and soil enzymes—thus disturbing the enzymatic

activity of the mesophile microbial community but allowing enzymatic resilience in most cases (Bécaert et al., 2006). These characteristics all make the RSSI method better suited to assessing the FS of metal-contaminated field soils.

However, past RSSI studies used spiked soils instead of field-contaminated soils and few soils were tested (Bécaert et al., 2006; Dussault et al., 2008). Furthermore, RSSI and any other FS methods are comparative: the score of a degraded soil is compared to the score of a reference/control soil. This approach by category is not suitable to assess metal toxicity since any causal relationship can be obtained from a comparative approach, meaning that any toxicity threshold could be calculated. An alternative could be to correlate FS scores to the contaminant concentration in order to obtain a causal relationship, which, in turn, generates regression parameters such as toxicity thresholds. However, no one to our knowledge has tested this approach. Still, this causal relationship implies that FS variability must chiefly be explained by the contaminant concentration and not by other soil properties—a concept seldom explored until now. Most of the effects of soil properties on FS were studied in agricultural ecosystems, and few were studied in contaminated soils (Kuan et al., 2007; Dussault et al., 2008; Chaer et al., 2009a; Gregory et al., 2009; Zhang et al., 2013). In any case, one important issue remains: RSSI and all other available FS scores do not take into account the site or contamination history inside the score, i.e. a normalization of the score by the background biological activity of the reference soil. Without this site normalization, site results could not be compared because background enzymatic activity is dependent on site physicochemistry (e.g. metallo-regions) (Vangheluwe et al., 2007).

To fill this gap, a new RSSI-based approach including three new RSSI-based scores adapted to a contamination context is proposed in this study. The aim is to determine which FS scores better assess the toxicity of metal-contaminated field soils. First, FS scores (existing and new ones) will be correlated to metal fractions in order to obtain causal relationships between FS and metal contamination and identify the best-suited FS score(s) for a metal contamination context. Then, the effect of soil physicochemical properties on the FS score will be analyzed in order to verify whether FS variability is better explained by soil properties other than metal concentration. Zinc was chosen for this study because several monometallic contaminated field-collected soils of

various Zn concentrations were available and also because Zn is a co-factor of several soil hydrolytic enzymes with inhibitory effects at higher concentrations (Stephan et al., 2008).

## **4.5. Materials and methods**

### **4.5.1. Soil sampling and physicochemical characterization**

Twenty-five pairs of Zn-contaminated top soils (0-15 cm) from the province of Québec (Canada)—in each case a contaminated soil and an uncontaminated reference soil—were sampled under galvanized pylons and sieved in the field to < 2 mm. The contaminated soil was sampled under the pylon and the reference soil was sampled 25±5 m from the pylon. A visual inspection (texture, color) was carried out in the field in order to sample a reference soil with physicochemical properties similar to those of the contaminated soil. Laboratory analyses (pH, texture, organic carbon and total metal concentration) were conducted to select 20 pairs with the closest physicochemical properties (except for total Zn concentration) prior to the biological analyses. Field-moist sieved soils were stored at 4°C in a covered inert plastic box.

The soil pH was measured in the supernatant of a 1:2 soil-solution ratio of 0.01M KNO<sub>3</sub> (extra pure grade) (Stephan et al., 2008). The cationic exchange capacity (CEC) was analyzed using the ammonium acetate method at pH 7.0 (Carter & Gregorich, 2008). The buffering capacity was analyzed by pH measurement after the addition of solutions of increasing nitric acid concentrations (Carter & Gregorich, 2008). The total carbon was analyzed by combustion method and the total organic carbon (TOC) with the Walkley-Black procedure using acid-wet oxidation methods with dichromate solution (Carter & Gregorich, 2008). The dissolved organic carbon (DOC) was extracted by mixing the soil in a 1:10 soil-solution ratio of 0.01M KNO<sub>3</sub>. After centrifugation, the supernatant was filtered and the DOC concentration of the filtrate was then analyzed with a TOC analyzer (GE Laboratory Analyzer Sievers 5310C, Montréal, Qc, Canada) (Carter & Gregorich, 2008). The texture (% sand, % silt, % clay) was determined by hydrometric analysis preceded by pre-treatment of soil organic matter and Fe and Al sesquioxides (Carter & Gregorich, 2008). All the physicochemical analyses were done in triplicate, except for the texture analysis for which only one sample per soil was analyzed.

Metals were extracted by  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-HF}$  total digestion (Csuros & Csuros, 2002), and the total metal content (Al, Mn, Co, Ba, Ni, Cu, Pb, Cd, Zn) of the diluted and filtrated digests was then analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Varian ICP-820M, Montréal, Qc, Canada). The total soluble Zn and labile Zn fractions were extracted by 0.01M  $\text{KNO}_3$  solution (1:2 soil-solution ratio, extra pure grade  $\text{KNO}_3$  chemical) (Stephan et al., 2008). Part of the filtered sample was acidified to 2% (v/v) with  $\text{HNO}_3$  (environmental grade), and the acidified sample concentration was analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry to measure the total soluble metal concentration (ICP-MS, Varian 820-MS, Montréal, Qc, Canada). The other part of the filtered sample was not acidified, and the labile Zn concentration was immediately (i.e. same day) measured by square wave anodic stripping voltammetry (SW-ASV, polarographic stand VA663 of Metrohm and voltammeter 100B of Bioanalytical System, Québec, Qc, Canada). The minimal and normalized electrolytic 0.01M  $\text{KNO}_3$  soil solution sample was required for the voltammetric measurements (Stephan et al., 2008).

#### **4.6. RSSI method and FS scores calculation**

##### **4.6.1. Overview of the time-integrated RSSI method**

Enzyme functional stability calculation was based on the time-integrated FS method developed by Bécaert et al. (2006). Each soil (reference and contaminated soils) was subdivided into two microcosms (one to be disturbed and one undisturbed) for a total of four microcosms per pair of soils. These microcosms were pre-incubated at room temperature (22°C) at 60% (w/w) of their water holding capacity four days prior to the analyses in order to optimize and stabilize the microbial activity. For each disturbed soil microcosm, the enzymatic activity (EA) of four enzymes was measured at days 1, 2, 4, 7 and 11 after an LC heat disturbance (60°C for 24 h) simulating a severe drought from summer heat wave episodes. Preliminary experiments showed that the incubation time (i.e. 11 days) was sufficient to reach an asymptotic EA stabilization (Dussault et al., 2008). The enzymatic activity of the undisturbed soil was measured at days 1, 7 and 11 in order to validate that the EA of undisturbed microcosms remained constant over time. The enzymatic assay activity of arylsulfatase (EC 3.1.6.1), phosphatase (EC 3.1.3.2), protease (EC 3.4.21.92) and urease (EC 3.5.1.5) was analyzed for each microcosm. These enzymes were selected because S-, P- and N-cycle bioindicators are known to be more sensitive and less stable



to trace metal contamination than C-cycle ones (Deng et al., 2009). Short-term assays were selected to limit enzyme synthesis during incubation and assess abiotic extracellular EA (Nannipieri et al., 2002). Thus, all enzyme assays were incubated for 2 h in order to standardize the incubation time and facilitate experimental design. Furthermore, all four enzymatic assays were incubated in H<sub>2</sub>O as a surrogate solvent instead of buffer, since EA in buffer or H<sub>2</sub>O produce similar results (Lessard et al., 2013a). The EA of each soil sample was analyzed in triplicate in addition to duplicate controls (soil samples for which the substrate was added only after the 2-h incubation). Detailed enzymatic assay procedures are described in Lessard et al. (2013a).

#### 4.6.2. FS scores calculation

The RSSI method was calculated using the time integration of the EA function. To do so, areas under EA response curves of the four microcosms plotted against time after the disturbance were integrated using the trapezoidal rule as a numerical approach to approximate the definite integral. Original RSSI scores developed by Bécaert et al. (2006) are ratios of integrals of a disturbed soil sample on an undisturbed soil sample. Each reference and contaminated soil has its own RSSI (FS scores no.1 in Table 4.6-1). Three new RSSI-based scores were also calculated, taking the contamination history of the soil directly into account in the FS index (FS scores no.6, no.7 and no.8 in Table 4.6-1). RSSI scores close to 1 indicate that the soil enzyme is stable when the soil is faced with a disturbance. RSSI scores close to 0 indicate that the enzyme is not functionally stable. An RSSI score higher than 1 means that the integral score related to the numerator (disturbed contaminated soil) is larger than the integral related to the denominator and suggests that EA is stimulated by the disturbance. Figure 4.6-1 illustrates the areas under the curve corresponding to the numerator and denominator of the ratios of the RSSI-based FS scores.

The four existing FS score methods proposed in past studies were also calculated (FS scores no.2, no.3, no.4 and no.5 in Table 4.6-1) (Griffiths et al., 2000; Orwin & Wardle, 2004; Chaer et al., 2009a; Zhang et al., 2010). Score selection was based on the review by Griffiths and Philippot (2013). This study only calculated FS scores used or developed in recent years. Though certain authors proposed resistance and resilience scores, only resilience scores were calculated since it was shown that resilience predicts FS better than resistance (Shade et al., 2012). To facilitate reading, early scores are identified by the first author to develop them.

Table 4.6-1: Description of functional stability scores used in this study

Properties			FS score ID		Description	FS equation related to reference soil	FS equation related to contaminated soil
Existing scores	Two scores per pair of soils comparing reference soil to contaminated soil	Dynamic (integral)	#1	Bécaert (Bécaert et al., 2006)	Original RSSI score integrated over 11 days	$\frac{\int_1^{11} R_D(t) dt}{\int_1^{11} R_{UD}(t) dt}$	$\frac{\int_1^{11} C_D(t) dt}{\int_1^{11} C_{UD}(t) dt}$
			#2	Zhang (Zhang et al., 2010)	Zhang resilience score integrated over 11 days	$\int_1^{11} \left( \frac{R_D(t)}{R_{UD}(t)} \right) \times 100 dt$	$\int_1^{11} \left( \frac{C_D(t)}{C_{UD}(t)} \right) \times 100 dt$
		Static (spot time)	#3	Griffiths (Griffiths et al., 2000)	Griffiths resilience score at day 11	$(R_{UD}(11) - R_{UD}(11)/R_D(11)) \times 100$	$(C_{UD}(11) - C_{UD}(11)/C_D(11)) \times 100$
			#4	Chaer (Chaer et al., 2009a)	Chaer score at day 11	$\ R_D(11)/R_{UD}(11) - 1\  \times 100$	$\ C_D(11)/C_{UD}(11) - 1\  \times 100$
			#5	Orwin & Wardle (Orwin & Wardle, 2004)	Orwin & Wardle resilience score at day 11	$\left( \frac{2( R_{UD}(0) - R_D(1) )}{ R_{UD}(0) - R_D(1)  +  R_{UD}(11) - R_D(11) } \right) - 1$	$\left( \frac{2( C_{UD}(0) - C_D(1) )}{ C_{UD}(0) - C_D(1)  +  C_{UD}(11) - C_D(11) } \right) - 1$
New score proposed	One score per pair of soils including the site and contamination history	Dynamic (integral)	#6	$RSSI - a$	New RSSI-based score integrated over 11 days	$\frac{\int_1^{11} C_D(t) dt}{\int_1^{11} R_D(t) dt}$	
			#7	$RSSI - b$	New RSSI-based score integrated over 11 days	$\frac{\int_1^{11} C_D(t) dt}{\int_1^{11} R_{UD}(t) dt}$	
			#8	$RSSI - c$	New RSSI-based score integrated over 11 days	$\frac{\int_1^{11} \left( \frac{C_D(t)}{C_{UD}(t)} \right) dt}{\int_1^{11} \left( \frac{R_D(t)}{R_{UD}(t)} \right) dt}$	

C = contaminated soil, R = reference soil, D = disturbed, UD = undisturbed, (t) = integrated over time, Sample(x) = sample measured at day x

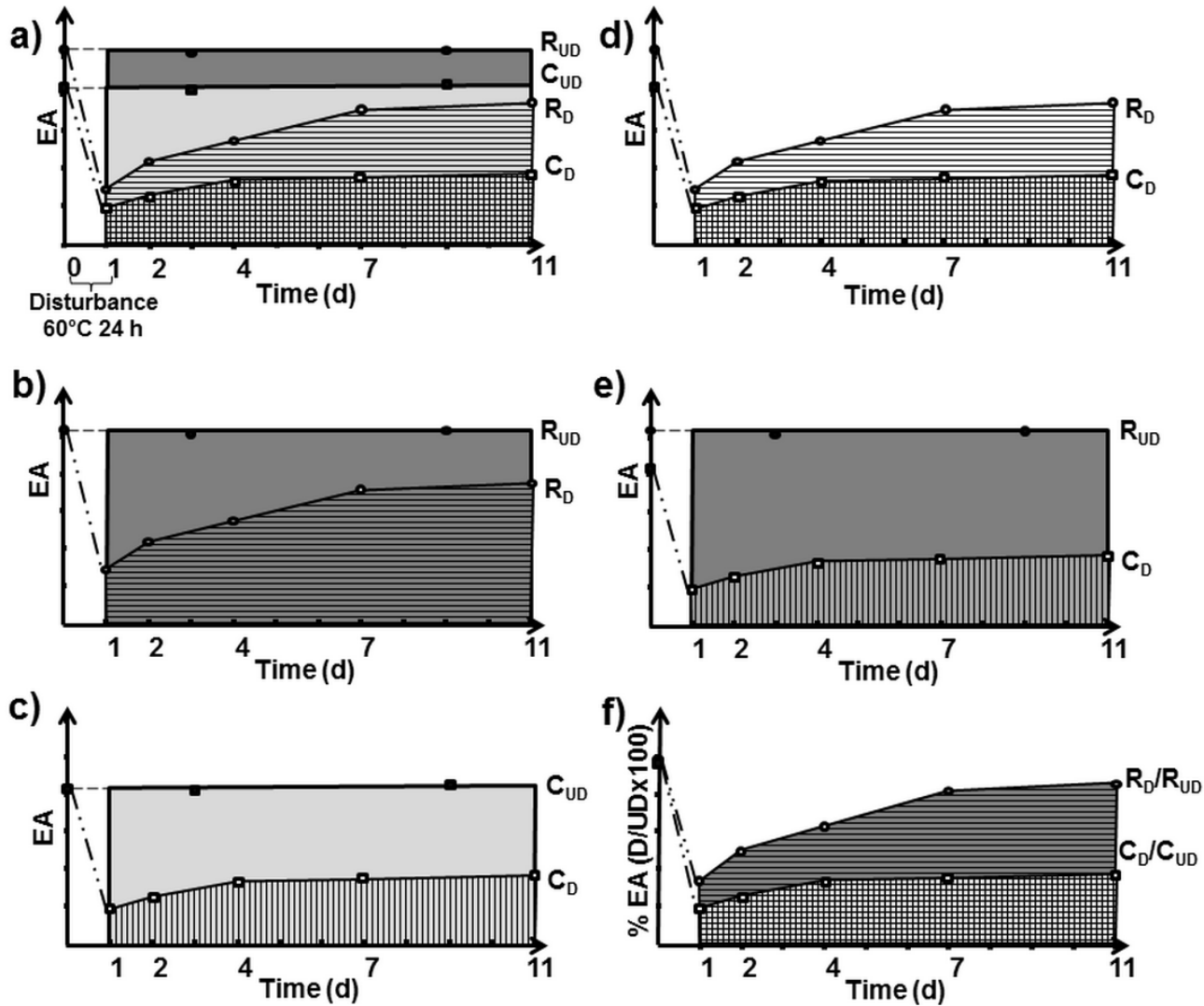


Figure 4.6-1 : Schematic examples of the RSSI method and the calculation of the five RSSI scores described in section 4.6.2 (Adapted from Bécaert *et al.* (2006)). Plot a) is an overview of the RSSI method and includes all the areas under curves needed to calculate the different types of RSSI: contaminated-disturbed ( $C_D$ ) soil (vertical line area, a squared area when superposed on the horizontal-lined area), reference-disturbed soil ( $R_D$ ) (horizontal line area), contaminated-undisturbed ( $C_{UD}$ ) soil (light gray area) and reference-undisturbed ( $R_{UD}$ ) soil (all light and dark gray area). Plots 1b) and 1c) illustrate areas under curves used to calculate the  $RSSI_{Ref}$  and  $RSSI_{Cont}$  scores, respectively. Plots 1d), 1e) and 1f) are schematic illustrations of the areas under curve involved in  $RSSI_a$ ,  $RSSI_b$  and  $RSSI_c$  scores, respectively.

#### 4.6.3. Bivariate regressions of FS scores against Zn concentration

Each FS score was plotted against the soil Zn concentrations (total, total soluble and labile), and these bivariate regressions were analyzed. From these regressions, the coefficient of determination  $R^2$  was recorded in order to quantify regression strength and identify biologically relevant regressions ( $R^2 > 0.50$ ) (Scherrer, 2009). The  $EC_{50}$  toxicity threshold, i.e. the metal concentration affecting 50% of the population (here, the maximal enzymatic FS), was also recorded to obtain a comparative baseline between regressions with similar  $R^2$  and determine the most sensitive models, i.e. those with the lowest  $EC_{50}$ . Three mathematical models (hyperbolic partial inhibition, hyperbolic full inhibition and sigmoidal logistic dose-response) were tested in order to find the best fit to model the enzymatic FS results (Table 4.6-2). These models were selected according to their relevancy and frequency of use in the literature to correlate enzymatic FS results and metal concentrations. Once the regression parameters were recorded, a best-fit model ranking was drawn up according to an Akaike information criterion coefficient (AICC)—a statistical measure of the goodness-of-fit for model comparison (Scherrer, 2009). The curve that fit the regressions was created using CurveExpert Professionnal 1.5.0 software. Statistical postulates (normality of residues and homogeneity of variance) were systemically tested in parallel for every regression.

Table 4.6-2: Mathematical models tested on bivariate regressions of FS scores against Zn concentration (total, total soluble or labile)

Model ID	Description	Model equation and $EC_{50}$ where y is a FS score	Parameters description	Comments and References
M1	Hyperbolic partial inhibition	$y = \frac{c * (1 + ax)}{(1 + bx)}$ $EC_{50} = \frac{(1 - a/b)}{(b - a)}$	a, b and c depend on several enzymatic inhibition parameters but must always be > 0 and b > a x = [metal concentration]	Reach an asymptote parallel above the x-axis, i.e. enzymatic responses are never fully inhibited More suitable to study enzyme kinetics in heterogeneous systems such as soils (Speir et al., 1995) (Moreno et al., 2001) (Renella et al., 2003)
M2	Hyperbolic full inhibition	$y = c(1 + bx)$ $EC_{50} = 1/b$	b and c depend on several enzymatic inhibition parameters but must always be > 0 x = [metal concentration]	Implies that there is no background enzymatic activity at high contaminant concentration (Speir et al., 1995) (Moreno et al., 2001)
M3	Sigmoidal logistic dose-response	$y = \frac{c}{(1 + e^{b(x-a)})}$ $EC_{50} = e^a$	a = $\ln EC_{50}$ b = slope parameter c = uninhibited y value x = $\ln$ [metal concentration]	Customarily used in toxicity assessment (Haanstra et al., 1985) (Moreno et al., 2001)

#### 4.6.4. Relationships among RSSI scores and physicochemical properties

Principal component analysis (PCA) based on correlations was carried out on the most relevant FS score(s) determined during the data treatment described in the previous section in order to study the influence of soil physicochemical properties on enzymatic FS to verify whether Zn concentration wholly explains FS variability. PCA was conducted using JMP 9.0.0 software (SAS Institute Inc.).

### 4.7. Results

#### 4.7.1. Physicochemical characterization

The physicochemical properties of the 20 pairs of Zn-contaminated field-collected soils are reported in Table 4.7-1. The field-collected soils showed geological background levels for total concentrations of Al, Mn, Co, Ba, Ni, Cu, Pb and Cd. The total Zn concentration varied from background levels for reference soils to well above the industrial land-use threshold of contaminated soils ( $>1500 \text{ mg of total Zn} \cdot \text{kg}^{-1}$  of dry soil), according to the generic criteria for soil protection set out by the government of Québec (MDDEP, 1998). For all 20 pairs of soil, total, total soluble and labile Zn concentrations in contaminated soils were significantly higher than in its paired reference soil. Certain physicochemical differences were observed but these differences in soil properties remain low, meaning that the contaminated soil and the reference soil can be grouped as a pair of soils (see Table 4.9-1 for detailed physicochemical information per pair of soils).

Table 4.7-1: Main statistical information related to the physicochemical properties of Zn-contaminated field soils (see Table 4.9-1 for details)

		pH	CEC (meq+/ 100g ds)	BC cmol H <sup>+</sup> /kg ds/ pH unit	TOC g/kg ds	DOC mg/kg ds	Sand %	Silt %	Clay %	Total Zn content mg/kg ds	Soluble Zn content mg/L ds	Labile Zn content mg/L ds
<b>Contaminated n=20</b>	<b>Mean</b>	5.76	44	19	78	44	71.3	21.0	7.7	1992	13.67	10.47
	<b>SD</b>	0.87	52	16	105	60	17.9	13.5	7.1	1934	16.16	20.87
	<b>Maximum</b>	6.96	247	64	408	259	94.0	46.0	26.0	9179	49.77	96.76
	<b>Minimum</b>	3.71	15	2	12	2	40.0	3.1	0.0	403	0.07	0.01
<b>Reference n=20</b>	<b>Mean</b>	5.80	44	21	57	26	67.4	21.8	10.9	184	0.29	0.08
	<b>SD</b>	1.00	44	21	77	24	23.0	15.7	9.9	138	0.42	0.17
	<b>Maximum</b>	7.09	186	88	334	82	98.0	54.0	30.0	507	1.60	0.52
	<b>Minimum</b>	3.34	15	2	9	2	29.8	2.0	0.0	55	0.01	0

CEC = Cation exchange capacity, BC = Buffer capacity, TOC = Total organic carbon, DOC = Dissolved organic carbon, meq+ = milliequivalent of hydrogen, ds = Dry soil basis, SD = standard deviation

#### 4.7.2. Bivariate regressions of FS scores against Zn concentration

Bivariate regressions were constructed for each enzyme and each mathematical model using the RSSI scores (Bécaert RSSI<sub>Cont</sub>, RSSI-a, RSSI-b and RSSI-c) and Zhang, Griffiths, Chaer and Orwin & Wardle resilience scores of the contaminated soils as y-axis variables, and Zn concentration of contaminated soil as x-axis variables (ln-transformed for dose-response curve M3). Only regressions plotted against labile Zn concentrations are given since they induced the strongest regressions. To equitably analyze each regression, four data points determined to be outliers in terms of normality and homogeneity of variance were excluded per regression (20% of the data). Since each regression was analyzed independently following a systematic statistical analysis, the outlier soil ID varied among regressions. The coefficient of regression  $R^2$ ,  $EC_{50}$  threshold and rank of best-fit model based on Akaike information criterion coefficient (AICC) for the regressions are summarized in Table 4.7-2. It was not relevant to use the RSSI<sub>Ref</sub> score or others scores related to reference soils as y-axis variables since 1) the total Zn concentration of these soils mostly belongs to background Zn concentration and 2) the aim of the analysis is to assess Zn toxicity. Gray-shadow cells are combinations of enzyme FS, models and FS scores where the coefficient of regression of the resulting relationship is considered biologically relevant ( $R^2 > 0.50$ ) (Scherrer, 2009).



Table 4.7-2: Coefficient of regression  $R^2$ ,  $EC_{50}$  (expressed as  $\mu\text{g labile Zn}\cdot\text{L}^{-1}$  of dry soil) and rank of best-fit model based on AICC obtained from the regressions constructed using different FS scores related to contaminated soil as y-axis and the labile Zn concentration as x-axis (n=16). Results of three models are summarized: Partial inhibition model (M1), full inhibition model (M2) and sigmoidal logistic dose-response model (M3). Interpretation of the best-fit rank columns: 1st ranked model is better fitted than 2nd ranked model, and so on. Regressions considered biologically relevant ( $R^2>0.50$ ) are gray-filled.

	Model	Arylsulfatase			Protease			Phosphatase			Urease		
		$R^2$	$EC_{50}$ $\mu\text{g labile Zn/L}$	Best fit rank	$R^2$	$EC_{50}$ $\mu\text{g labile Zn/L}$	Best fit rank	$R^2$	$EC_{50}$ $\mu\text{g labile Zn/L}$	Best fit rank	$R^2$	$EC_{50}$ $\mu\text{g labile Zn/L}$	Best fit rank
RSSI <sup>a</sup> <sub>Cont</sub>	M1	0.09	121938	2nd	0.63	755	2nd	0.48	NM <sup>b</sup>	2nd	0	0	0
	M2	0.08	NM <sup>b</sup>	1st	0.54	7688	3rd	0.48	11941	1st	0.26	NM <sup>b</sup>	1st
	M3	0.05	4.457E31	3rd	0.64	1013	1st	0.49	10804	3rd	0.15	NM <sup>b</sup>	2nd
RSSI-a	M1	0.51	452	1st	0.46	468	2nd	0.36	1922	2nd	0.12	393	1st
	M2	0.39	9548	3rd	0.37	3834	1st	0.36	18052	1st	0.10	42947	2nd
	M3	0.46	3076	2nd	0.42	1450	3rd	0.36	18522	3rd	0.10	40266	3rd
RSSI-b	M1	0.51	455	1st	0.66	359	1st	0.33	NM <sup>b</sup>	3rd	0.70	387	1st
	M2	0.38	6006	3rd	0.52	1010	3rd	0.25	42576	1st	0.50	5585	3rd
	M3	0.46	1508	2nd	0.62	647	2nd	0.36	17856	2nd	0.64	941	2nd
RSSI-c	M1	0.14	50791	1st	0.62	1032	1st	0	0	-	0.47	NM <sup>b</sup>	1st
	M2	0.11	NM <sup>b</sup>	2nd	0.57	8967	3rd	0.07	87004	1st	0.32	NM <sup>b</sup>	3rd
	M3	0.11	2.559E22	3rd	0.62	4033	2nd	0.13	20495	2nd	0.45	NM <sup>b</sup>	2nd
Zhang	M1	0	0	-	0.68	2271	1st	0	0	-	0	0	-
	M2	0.06	NM <sup>b</sup>	1st	0	0	-	0	0	-	0.01	NM <sup>b</sup>	1st
	M3	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0.08	TH <sup>c</sup>	2nd
Griffiths	M1	0	0	-	0	0	-	0.24	740	1st	0	0	-
	M2	0	0	-	0	0	-	0.9	NM <sup>b</sup>	2nd	0.76	2057	2nd
	M3	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0.77	2201	1st
Chaer	M1	0	0	-	0.29	48	1st	0	0	-	0.60	12600	1st
	M2	0	0	-	0.11	15189	2nd	0	0	-	0	0	-
	M3	0.02	5460	1st	0	0	-	0.12	TH <sup>c</sup>	1st	0	0	-
O&W <sup>d</sup>	M1	0.13	3	2nd	0.20	1091	1st	0	0	-	0.75	NM <sup>b</sup>	1st
	M2	0.11	6	1st	0	0	-	0.01	0.01	1st	0.47	NM <sup>b</sup>	2nd
	M3	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-

<sup>a</sup> Original RSSI score related to contaminated soil

<sup>b</sup> NM =  $EC_{50}$  not measurable because RSSI score is stimulated by the labile Zn concentration

<sup>c</sup> TH = Too high

<sup>d</sup> O&W: Orwin & Wardle

Most of the biologically relevant regressions belong to the upper part of Table 4.7-2 and correspond to RSSI or new RSSI-based scores. The FS score with the highest number of biologically relevant regressions is RSSI-b (7/12 compared to 3/12 for Bécaert RSSI<sub>Cont</sub> and RSSI-c scores, 2/12 for Griffiths and Orwin & Wardle scores, 1/12 for Zhang score, RSSI-a and Chaer scores). The RSSI-b scores of three enzymes (arylsulfatase, protease and urease) were affected by the labile Zn, as compared to one enzyme affected for other scores. Notice that the urease FS was stimulated by Zn for the Orwin & Wardle score, where the EC<sub>50</sub> could not be calculated since it is a toxicity threshold that is irrelevant when predicting biological function stimulation. Phosphatase FS was insensitive to Zn for every score. Focusing only on the RSSI-b score, the models with the best-fit ranks are the partial enzymatic inhibition model (M1), followed by the sigmoidal logistic model (M3) and the total inhibition model (M2). Additionally, the R<sup>2</sup> of the M1 regressions was higher than the other models.

#### 4.7.3. Relationships among RSSI scores and physicochemical properties

Based on these results, a principal component analysis (PCA) was carried out using only the RSSI-b score and all other soil physicochemical properties in order to cut redundant information and target relationships between soil properties and FS. Of the 15 principal components entered in the PCA (i.e. 15 variables), the Kaiser-Guttman criteria identified five principal components (PC) that included the minimal nominal information on variance, i.e. where eigenvalues were lower than 1. The PC1 and PC2 explained 65.9% of the total variance of the PCs, and their eigenvectors are illustrated in Figure 4.7-1.

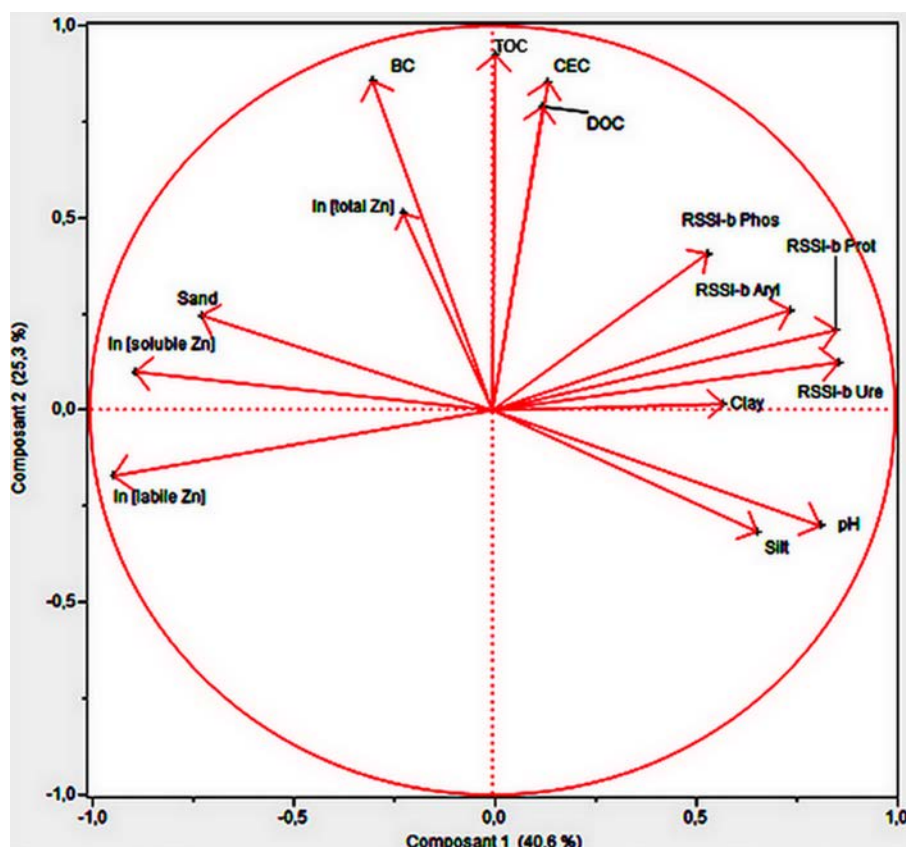


Figure 4.7-1 : Bi-dimensional graph of the two main PCs illustrating the RSSI-b vectors of the four enzymes and the physicochemical vectors (n=16, Rapide Blanc, Laval, Mascouche 2 and St-Bruno soils excluded). Legend: Aryl=arylsulfatase, Prot= protease, Phos=phosphatase and Ure=urease.

The PC1 explained 40.6% of the total variance and was not highly correlated to a specific soil variable but rather associated to RSSI-b of arylsulfatase, protease and urease, pH, total soluble and labile Zn (ln-transformed), when only eigenvectors higher than 0.30 were considered. The PC2 (25.3%) was, on average, associated with CEC, buffer capacity, COT and DOC. PC3 (13.0%), PC4 (8.7%) and PC5 (7.0%) are not detailed or illustrated since their nominal information on variance was low as compared to PC1 and PC2. Figure 4.7-1 shows that vectors related to the RSSI-b of arylsulfatase, protease and urease were positively correlated since they form a group of vectors that are nearly parallel to each other. The RSSI-b phosphatase vector is further and shorter than other RSSI-b vectors, meaning that it explained less of the variance of the two main PCs. The ln-transformed labile Zn vector and, to a lesser extent, the ln-transformed total soluble Zn vector are long and rotated at almost 180° from the RSSI-b vectors of

arylsulfatase, protease and urease, meaning that these Zn fractions were inversely correlated to FS, expressed as RSSI-b score. The ln-transformed total Zn vector is short and almost completely orthogonal to the RSSI-b vectors group, meaning that it is not correlated to FS. The pH and soil texture were partially correlated to RSSI-b vectors since they are rotated approximately 45° or 130° from the RSSI-b vectors group, whereas organic matter (DOC and COT), CEC and buffer capacity are orthogonal of RSSI-b vectors, meaning that they were weakly correlated with FS.

## 4.8. Discussion

### 4.8.1. Bivariate regressions of FS scores against Zn concentration

The new RSSI-b score proposed in this study better assessed the toxicity of metal-contaminated soils than the other RSSI or FS scores that were calculated. The RSSI-b score detected Zn toxicity on three enzymes (arylsulfatase, protease and urease), whereas the other scores (Bécaert RSSI<sub>Cont</sub>, RSSI-a, RSSI-c, Zhang, Griffiths and Chaer scores) only detected Zn toxicity on one enzyme (protease, arylsulfatase, protease, protease, urease and urease, respectively).

The comparison of the current results with the few other enzymatic FS studies available showed that Dussault et al. (2008) found a negative correlation between  $\log \text{Cu}^{2+}$  and protease Bécaert RSSI scores using the Bécaert method. As suggested by the authors, the RSSI method related to protease seems to be a good candidate to detect metal effects, and the enzyme should be systematically included in the design of experiment of enzymatic FS studies of metal-contaminated soil. Furthermore, Bécaert et al. (2006) showed that clean soil had higher enzymatic FS stability than 2,4-D contaminated soil according to  $\beta$ -glucosidase, urease and arylsulfatase activity. To our knowledge, there is no enzymatic FS study on phosphatase activity. Regarding the urease FS, its sensitivity to pre-stressed soils is contradictory among studies. For example, Bécaert et al. (2006) showed that urease was less stable in 2,4-D contaminated soils than those uncontaminated, while agricultural soils amended with organic matter or inorganic fertilizers (N, P and/or K) showed higher urease stability to several drying-rewetting cycles as compared to unamended soils (Chaer et al., 2009a; Zhao et al., 2010). In the current study, the Orwin & Wardle score was stimulated by Zn, which was opposite to the RSSI-a, RSSI-b, Griffiths and Chaer scores. The higher nutrient concentration (organic matter, N, P, K, etc.) in these soils may explain these divergences. Past studies using conventional urease assays without

FS assessment also yielded inconsistent results. For example, in some studies, urease was adversely affected by Zn (Chaperon & Sauvé, 2007; Moreno et al., 2009), while others recorded urease insensitivity or stimulation by Zn (Renella et al., 2005a; Li et al., 2009). Urease (EA and FS) seems to have a context-specific sensitivity depending on several factors including soil properties and the experimental design of the EA and FS assays and thus does not seem to be a reliable enzyme to study Zn soil ecotoxicity.

When only considering the RSSI-b score in the current study, pre-stressed microbial community became more vulnerable to additional stressors than an undisturbed community, as it was observed on arylsulfatase, protease and urease, where the enzymatic FS decreased when the labile Zn concentration increased (Tobor-Kapłon et al., 2006a). This stress-induced community sensitivity as it is called by Vinebrooke et al. (2004) could be attributed to 1) an extra energy cost (i.e. energetic burden) required to induce physiological tolerance mechanisms or 2) biodiversity losses resulting from genetic adaptation (Wallenstein & Hall, 2012). Dussault et al. (2008) also found a stress-induced-community sensitivity on protease FS after a 60°C heat disturbance. In addition, Kools et al. (2008) showed that ammonium leaching, basal respiration and earthworm/enchytraeid biomass were reduced in most (Pb-Cu-Zn)-contaminated soils faced with a 40°C heat disturbance. However, Epelde et al. (2012) did not observe any co-tolerance effect on protease since its activity remained stable after a 42°C heat disturbance on (Pb-Cd-Zn)-contaminated soils but suggested that soils were perhaps too negatively inhibited by the high field contamination level to observe EA fluctuation. Additionally, the selected temperature of the LC range was perhaps not severe enough to bring the selected biological functions out of their normal operating range, as observed in other studies that used a 40°C temperature as an LC stressor for analyzing the FS of substrate-induced respiration, respiration rate and bacterial growth rate (Tobor-Kapłon et al., 2006a; Gregory et al., 2009).

On one hand, when defining disturbance as a short-term stressor and stress as long-term stressor, as proposed by Tobor-Kapłon et al. (2006a), it is interesting to note that stress-induced-community-sensitivity is mainly observed in “disturbance-on-stress” experimental designs such as heat-on-metal studies, where the two stressors affect different biochemical mechanisms (Dussault et al., 2008; Kools et al., 2008; Epelde et al., 2012). On the other hand, stress-induced-community-tolerance, which stipulates that pre-stressed microbial communities are better suited

to withstand another natural or anthropogenic stressor, is often observed in “stress-on-stress” experimental designs in which the two stressors are of a similar nature (Philippot et al., 2008; Deng et al., 2009). A final study showed that potential nitrification rate (PNR) stability was unrelated to Zn concentration in four Zn-contaminated field soils after LC stressors such as pesticide application, three freeze-thaw cycles or three dry-wet cycles, meaning that metal tolerance was independent of FS in this case (Mertens et al., 2007b). Ecosystems that face an additional stressor thus seem related to the nature (disturbance or stress) and the choice of the LC stressor and the biological function monitored (Tobor-Kapłon et al., 2006a).

#### 4.8.2. Fit model comparison

The partial inhibition model (M1) best fit the data by providing the highest regression coefficients ( $R^2$ ). Once the  $R^2$  determined the strongest regressions, the  $EC_{50}$  parameters obtained from these regressions play an important role in selecting the best-fit model because they point out the mathematical model that is the most protective, i.e. in which the  $EC_{50}$  is the lowest. Thus, the M1 model provided a protective approach for diagnosing Zn toxicity since its related  $EC_{50}$  was lower than the other models'. Moreno et al. (2001) found that enzymatic inhibition models (M1 and M2 models) better fit the data than a sigmoidal logistic dose-response model (M3). Even if their  $EC_{50}$  were lower and their  $R^2$  were slightly higher using the partial rather than total inhibition model, the authors preferred the total inhibition model to the partial one because of the specificity of the  $EC_{50}$  calculated from the partial enzymatic model. In truth, the  $EC_{50}$  calculated from the partial inhibition model (M1) is not an  $EC_{50}$  value per se but rather the concentration associated with the average enzymatic result between the highest and asymptotic lowest enzymatic FS scores (Speir et al., 1995). Thus, the calculated  $EC_{50}$  parameter is lower than the concentration truly affecting 50% of the maximal FS score value. In our opinion, this distinct protective  $EC_{50}$  is still suitable in ecotoxicology because the background value of the enzymatic activity and stability hardly reach zero. Indeed, part of the hydrolases in soils are bound to clay or soil organic matter and likely protected from direct inhibition by metal or indirect inhibition by its effect on microbial activity (Nannipieri et al., 2002). However, even if certain field-collected soils were highly contaminated in terms of labile Zn (e.g. Mascouche 1 and Lac Henri samples, see Table 4.9-1), there was not enough data available to fit enzymatic FS results at extremely high  $\ln$ -transformed labile Zn concentrations. Consequently, even if the total enzymatic inhibition

model yielded weaker regressions, the model should still be systematically tested to assess the effect of contaminants on the enzymatic results in order to provide insight into the state of the enzymatic FS at extreme contaminant concentrations.

#### 4.8.3. RSSI score-physicochemical property relationships

The RSSI-b scores of the Zn-contaminated field soils were highly correlated with the labile and total soluble Zn concentrations, moderately correlated with soil pH (i.e. neutral soils more stable than acidic soils) and texture (i.e. clayey and silty soils more stable than sandy soils) but, surprisingly, not correlated with organic matter (total or dissolved) or other soil properties, thus suggesting that FS mainly depends on the speciation of Zn, which in turn is governed by soil properties such as pH, texture and organic matter. The literature reports divergent results on the effects of soil properties on FS. For example, Gregory et al. (2009) found that the substrate-induced respiration (SIR) resilience of their 15 uncontaminated arable and grassland soils after heat disturbance (40°C) was higher in clayey soils than in sandy soils, which is consistent with our results. In addition, Kuan et al. (2007) and Dussault et al. (2008) showed that TOC and DOC were not associated with FS after a heat disturbance (40°C, 40°C and 60°C, respectively). Conversely, other studies showed that the FS of land-managed soils after a heat disturbance was highly correlated with TOC (Kuan et al., 2007; Chaer et al., 2009a; Gregory et al., 2009; Zhang et al., 2013). These contradictory results may be explained by high nutrient concentrations (organic matter or C, P, K, etc.) resulting from diverse land management choices (same idea conveyed in section 4.1) as compared to the low TOC and DOC measured in our uncultivated/unmanaged/unfertilized Zn-contaminated field soils. It is still not clear whether the enzymatic FS is solely governed by the labile Zn, which is in turn regulated by the soil physicochemical properties, or if it is affected by a combination of soil properties such as metal concentration, pH and texture. However, organic matter clearly does not affect the enzymatic FS of the soils.

#### 4.8.4. Limitations and perspectives of the RSSI-based method

The new RSSI-based method to assess long-term metal toxicity in field-contaminated soils proposed in this study has certain limitations. For example, the RSSI method does not take possible natural reseeded by nearby microbial communities into account since the experiments

are done in microcosms—an important factor that facilitates community resilience on field (Shade et al., 2012). Furthermore, working with empirical measurements of field-contaminated soils provides the most realistic results (Wallenstein & Hall, 2012; Zell & Hubbart, 2013) but also leads to the highest variability.

In recent years, many studies invited ecological scientists to pursue research linking resilience to tolerance/adaptability and to the land use impacts of the agro-forestry industries (Shade et al., 2012; Wallenstein & Hall, 2012; Griffiths & Philippot, 2013; Pereira e Silva et al., 2013; Zell & Hubbart, 2013). Moreover, combining pre-stressed ecosystems and an LC disturbance in FS studies such as the “disturbance-on-stress” RSSI method has recently been promoted since it may clarify the role of disturbance in the diversity-function relationships (Shade et al., 2012). With the expected increase in extreme weather events due to climate change and ongoing agricultural and industrial pressures on nature, we can certainly anticipate an increase in multi-stressed ecosystems. It is therefore worth carrying out research using an RSSI-based method in order to promote a standardized FS tool to study the effects of land use management and contaminants on microbial communities.



## 4.9. Supporting information

Table 4.9-1: Physicochemical properties of 20 pairs of field-collected soils

Soil ID (no, city, status) <sup>a</sup>			pH	CEC <sup>b</sup>	BC <sup>c</sup>	TOC <sup>d</sup>	DOC <sup>e</sup>	Sand	Silt	Clay	Total Zn content	Soluble Zn content	Labile Zn content
				(meq/100g ds <sup>e</sup> )	cmol H <sup>+</sup> /kg ds <sup>f</sup> / pH unit	g/kg ds <sup>f</sup>	mg/kg ds <sup>f</sup>	%	%	%	mg/kg ds <sup>f</sup>	mg/L ds <sup>f</sup>	mg/L ds <sup>f</sup>
1	Rapide Blanc	C	4.73 ± 0.06	20.6 ± 1.9	7.6 ± 5.1	139.7 ± 5.1	258 ± 56	72	28	0	795 ± 47	4.050 ± 0.179	3.195 ± 0.118
	Rapide Blanc	R	4.55 ± 0.02	22.1 ± 3.4	2.3 ± 0.5	23.6 ± 0.5	44 ± 12	89	11	0	94 ± 10	1.602 ± 0.118	0.517 ± 0.010
	t-test	-	**	NS	NS	***	**	NA			***	***	***
2	Pointe-aux-Trembles	C	6.46 ± 0.08	34.1 ± 0.8	3.0 ± 1.4	35.4 ± 1.4	21 ± 4	52	33	15	1423 ± 16	0.0361 ± 0.010	0.517 ± 0.033
	Pointe-aux-Trembles	R	6.45 ± 0.08	41.9 ± 0.9	2.7 ± 0.2	35.8 ± 0.2	29 ± 9	39	32	29	59 ± 2	0.010 ± 0.001	NM <sup>g</sup>
	t-test		NS	***	NS	NS	NS	NA			***	***	***
3	Mascouche 1	C	4.58 ± 0.10	23.9 ± 4.1	7.4 ± 3.9	39.8 ± 3.9	28 ± 12	44	30	26	2915 ± 53	43.32 ± 0.680	96.757 ± 2.277
	Mascouche 1	R	5.96 ± 0.02	27.5 ± 2.0	4.0 ± 1.2	22.1 ± 1.2	12 ± 1	40	35	25	145 ± 41	0.011 ± 0.002	0.001 ± 0.001
	t-test		***	NS	NS	***	NS	NA			***	***	***
4	Laval	C	6.93 ± 0.01	20.8 ± 0.4	10.2 ± 5.0	27.7 ± 5.0	21 ± 7	61	33	6	717 ± 20	0.164 ± 0.075	0.077 ± 0.005
	Laval	R	7.09 ± 0.03	19.8 ± 0.4	4.3 ± 1.2	33.7 ± 0.2	14 ± 3	58	24	18	99 ± 7	0.022 ± 0.007	NM <sup>g</sup>
	t-test		***	*	NS	NS	NS	NA			***	*	***
5	St-Remi	C	6.19 ± 0.06	246.8 ± 5.0	51.1 ± 1.1	343.6 ± 4.7	92 ± 4	NM <sup>g</sup>			9179 ± 326	3.447 ± 0.450	0.088 ± 0.038
	St-Remi	R	6.52 ± 0.02	131.5 ± 20.8	35.6 ± 0.3	204.6 ± 8.1	40 ± 3	NM <sup>g</sup>			507 ± 30	0.142 ± 0.016	0.002 ± 0.001
	t-test	-	***	***	***	***	***	NA			***	*	***
6	St-Jean	C	6.65 ± 0.04	30.7 ± 12.2	18.5 ± 0.3	50.7 ± 3.3	12 ± 2	46	35	19	413 ± 93	0.121 ± 0.026	0.012 ± 0.002
	St-Jean	R	6.35 ± 0.07	29.2 ± 2.5	27.5 ± 0.2	46.8 ± 2.3	8 ± 2	30	40	30	180 ± 12	0.044 ± 0.010	0.002 ± 0.001
	t-test		**	NS	NS	NS	NS	NA			*	**	***
7	Laprairie	C	6.77 ± 0.06	27.6 ± 0.2	5.7 ± 0.2	37.4 ± 0.2	52 ± 1	57	33	10	308 ± 11	0.064 ± 0.009	0.008 ± 0.001
	Laprairie	R	6.67 ± 0.04	28.4 ± 1.4	3.6 ± 0.2	31.8 ± 0.2	44 ± 3	58	28	14	215 ± 15	0.018 ± 0.005	NM <sup>g</sup>
	t-test		NS	NS	***	**	**	NA			***	**	***
8	Joliette	C	6.54 ± 0.02	29.8 ± 1.2	13.8 ± 1.4	94.9 ± 1.4	64 ± 6	94	6	0	3988 ± 70	0.379 ± 0.064	0.467 ± 0.070
	Joliette	R	6.65 ± 0.02	28.3 ± 1.9	35.3 ± 5.9	103.3 ± 5.9	78 ± 11	98	2	0	669 ± 66	0.18 ± 0.015	0.057 ± 0.007
	t-test		**	NS	**	***	NS	NA			***	**	***
9	Mascouche 2	C	5.45 ± 0.07	21.9 ± 0.8	3.5 ± 0.5	36.5 ± 0.5	27 ± 7	94	6	0	1305 ± 41	9.740 ± 0.491	17.378 ± 0.642
	Mascouche 2	R	6.19 ± 0.07	15.3 ± 1.5	1.9 ± 0.1	17.3 ± 0.1	16 ± 5	88	11	1	79 ± 6	0.032 ± 0.006	NM <sup>g</sup>
	t-test		***	**	**	***	NS	NA			***	***	***

10	St-Bruno	C	6.23 ± 0.06	30.4 ± 0.7	15.6 ± 1.3	59.4 ± 1.3	36 ± 14	40	46	14	1407 ± 51	0.826 ± 0.058	1.051 ± 0.124
	St-Bruno	R	7.01 ± 0.03	16.9 ± 1.6	3.5 ± 1.2	15.3 ± 0.2	39 ± 12	36	54	10	123 ± 8	0.012 ± 0.008	NM <sup>g</sup>
	t-test		***	***	***	***	NS	NA			***	***	***
11	St-Sauveur	C	5.29 ± 0.12	14.9 ± 1.3	2.3 ± 0.2	14.1 ± 0.1	14 ± 6	87	13	0	403 ± 12	7.818 ± 0.099	13.273 ± 0.842
	St-Sauveur	R	4.55 ± 0.09	21.5 ± 1.0	9.1 ± 4.2	22.0 ± 0.2	23 ± 8	82	18	0	64 ± 5	0.483 ± 0.057	0.637 ± 0.043
	t-test		***	**	***	***	NS	NA			***	***	***
12	Montreal	C	5.29 ± 0.01	19.2 ± 2.3	2.3 ± 0.9	14.1 ± 4.9	42 ± 8	58	41	1	2582 ± 88	0.838 ± 0.076	0.587 ± 0.049
	Montreal	R	4.55 ± 0.05	17.9 ± 3.1	9.1 ± 0.4	22.0 ± 0.3	46 ± 9	43	50	7	247 ± 8	0.042 ± 0.017	0.002 ± 0.002
	t-test		**	NS	NS	**	NS	NA			***	***	***
13	Rawdon	C	5.51 ± 0.02	42.6 ± 3.4	37.4 ± 1.2	21.3 ± 0.9	2.0 ± 0.5	85	9	6	1082 ± 73	29.818 ± 0.270	11.472 ± 0.146
	Rawdon	R	5.82 ± 0.01	39.5 ± 2.2	38.4 ± 3.0	29.7 ± 2.4	4.5 ± 0.9	86	6	8	153 ± 5	0.126 ± 0.052	0.013 ± 0.004
	t-test		***	NS	NS	**	*	NA			***	***	***
14	Chateauguay	C	6.41 ± 0.08	38.6 ± 0.6	21.4 ± 0.4	93.6 ± 5.0	47 ± 4	88	3	9	2273 ± 114	1.907 ± 0.196	0.276 ± 0.043
	Chateauguay	R	6.48 ± 0.06	39.1 ± 0.9	21.5 ± 0.2	39.6 ± 0.5	19 ± 5	81	9	10	199 ± 74	0.060 ± 0.021	0.001 ± 0.001
	t-test		NS	NS	NS	***	**	NA			***	***	***
15	Baie Comeau	C	5.30 ± 0.15	19.4 ± 1.1	14.8 ± 0.3	20.1 ± 1.7	11.0 ± 1.2	93	5	2	1084 ± 75	27.217 ± 0.581	12.719 ± 0.498
	Baie Comeau	R	4.95 ± 0.06	19.8 ± 3.6	12.0 ± 1.0	15.5 ± 0.3	3.8 ± 0.5	90	6	4	55 ± 13	0.393 ± 0.063	0.106 ± 0.024
	t-test		*	NS	***	**	***	NA			***	***	***
16	St-Simeon	C	5.15 ± 0.04	24.1 ± 2.1	14.9 ± 0.2	18.7 ± 0.4	2.1 ± 0.2	86	9	5	1143 ± 33	36.934 ± 0.045	14.127 ± 2.577
	St-Simeon	R	4.85 ± 0.03	41.8 ± 1.8	26.3 ± 0.2	36.0 ± 2.7	4.8 ± 0.7	85	9	6	139 ± 14	0.918 ± 0.068	0.207 ± 0.090
	t-test		***	***	***	***	**	NA			***	***	***
17	Baie St-Paul	C	4.96 ± 0.06	44.2 ± 2.5	33.5 ± 1.0	31.0 ± 4.8	4.0 ± 0.1	79	13	8	1595 ± 98	33.341 ± 1.528	12.601 ± 0.372
	Baie St-Paul	R	4.59 ± 0.02	50.4 ± 1.3	32.9 ± 0.7	28.7 ± 1.4	2.1 ± 0.1	81	13	5	93 ± 6	0.128 ± 0.052	0.010 ± 0.002
	t-test		***	*	NS	NS	***	NA			***	***	***
18	St-Jean-Matha	C	3.71 ± 0.03	90.7 ± 4.9	63.9 ± 0.7	407.6 ± 12.1	144 ± 5	NM <sup>g</sup>			968 ± 88	9.457 ± 0.340	1.931 ± 0.065
	St-Jean-Matha	R	3.34 ± 0.02	185.6 ± 3.7	88.4 ± 3.9	333.6 ± 7.1	82 ± 5	NM <sup>g</sup>			320 ± 56	1.027 ± 0.009	0.039 ± 0.004
	t-test		***	***	NS	***	***	NA			***	***	***
19	Chomedey	C	5.86 ± 0.07	22.2 ± 3.0	23.0 ± 0.6	12.7 ± 0.7	3.0 ± 1.4	78	16	6	2729 ± 35	13.813 ± 0.27	6.049 ± 0.189
	Chomedey	R	5.63 ± 0.06	18.9 ± 2.9	33.5 ± 0.5	16.4 ± 1.0	4.0 ± 1.6	89	7	4	93 ± 2	0.242 ± 0.043	0.049 ± 0.007
	t-test		**	NS	***	**	NS	NA			***	***	***
20	Lac Henri	C	5.44 ± 0.08	24.1 ± 0.4	21.4 ± 0.1	11.5 ± 0.2	3.7 ± 0.6	70	20	10	3360 ± 99	49.771 ± 1.435	18.451 ± 0.617
	Lac Henri	R	5.52 ± 0.01	16.8 ± 2.4	38.5 ± 1.0	9.0 ± 0.2	4.7 ± 0.7	40	36	24	144 ± 5	0.188 ± 0.085	0.033 ± 0.012
	t-test		NS	**	***	***	NS	NA			***	***	***

Significance levels  $\alpha$ : \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001. NS = Not significant, NA = Not applicable

<sup>a</sup> Status: C=Zn-contaminated, R=reference, <sup>b</sup> CEC= Cationic exchange capacity, <sup>c</sup> BC= Buffer capacity, <sup>d</sup> TOC = Total organic carbon, <sup>e</sup> DOC = Dissolved organic carbon, <sup>f</sup> ds= Dry soil basis,

<sup>g</sup> NM = Not measurable: too much organic carbon (texture analysis) or under the limit of detection ( labile Zn concentration )

## **CHAPITRE 5. TROISIÈME MANUSCRIT: TOXICITY RESPONSE OF A NEW ENZYME-BASED FUNCTIONAL DIVERSITY METHODOLOGY FOR ZN-CONTAMINATED FIELD-COLLECTED SOILS**

### **Lien entre le deuxième et le troisième manuscrit**

La dernière étape du projet consistait à agréger les réponses enzymatiques des sols contaminés de sorte à générer un indice de diversité fonctionnelle sensible au Zn pour y extraire une donnée écotoxique  $EC_{50}$ . Deux approches enzymatiques agrégées ont été testées en parallèle : l'approche classique par l'activité enzymatique et l'approche par stabilité enzymatique optimisée. Pour y arriver, il fallait d'abord valider statistiquement la pertinence de l'agrégation des résultats enzymatiques individuels (activité ou RSSIb) pour chacune des approches. Il fallait ensuite identifier l'indice de diversité fonctionnelle enzymatique le plus sensible au Zn. Finalement, il fallait vérifier quelle approche enzymatique est la plus pertinente en terme d'indicateur écotoxicologique.

### **5.2. Présentation du troisième manuscrit**

L'évaluation de l'effet de stress dans les sols par des indices de diversité fonctionnelle microbienne basés sur les enzymes des sols est une avenue de plus en plus promue en écologie microbienne terrestre. Plusieurs indices de DF enzymatique ont été utilisés par le passé, mais aucune étude n'a généré de données écotoxiques comme les  $EC_{50}$ . Le but de cette étude est de produire une donnée  $EC_{50}$  réaliste à partir d'un indice DF enzymatique sensible au Zn présent depuis longtemps. L'activité de 6 enzymes (arylsulfatase, phosphatase, protéase, uréase,  $\beta$ -glucosidase et invertase) et le fractionnement du Zn (total, soluble et labile) a été mesuré dans 10 paires de sols contaminés par le Zn et collectés sur le terrain. Deux approches ont été étudiées en parallèle : l'activité enzymatique et la stabilité enzymatique évaluée par le score RSSIb. Les résultats enzymatiques (activité et stabilité) ont été agrégés en utilisant différents indices DF (moyenne pondérée et géométrique, indice de Shannon, Simpson ou Gini). Ces indices ont ensuite été corrélés aux concentrations de Zn afin de construire une courbe concentration-réponse et d'y extraire une donnée  $EC_{50}$ . Les régressions construites avec la moyenne pondérée de l'activité enzymatique et les concentrations soluble et labile de Zn étaient les plus fortes ( $R^2$  élevés), et les données  $EC_{50}$  obtenues de ces régressions se situaient dans une plage réaliste de Zn

biodisponible comparativement aux autres études. L'approche utilisant la stabilité enzymatique par les scores RSSIb agrégés a montré une sensibilité au Zn similaire à l'approche agrégée basée sur l'activité enzymatique. Par conséquent, bien que l'utilisation de la stabilité enzymatique ait été judicieuse et réfléchie dans le contexte d'une contamination à long-terme de Zn, l'augmentation des ressources requises pour son évaluation ne semble pas justifiée puisque cette approche n'offre pas d'information écotoxicologique complémentaire.

### 5.3. Abstract

Assessing the effects of stressors such as metals on soils by microbial functional diversity (FD) indexes based on soil enzymes is increasingly promoted. Various enzymatic FD indexes were used in past studies but none generated toxicity thresholds such as  $EC_{50}$ , the concentration affecting 50% of the maximum enzymatic activity. The aim of this study was to generate a realistic  $EC_{50}$  value from an enzyme-based FD index sensitive to Zn from long-term Zn-contaminated soils. Enzymatic assays of 6 soil enzymes (arylsulfatase, phosphatase, protease, urease,  $\beta$ -glucosidase and invertase) and metal characterization (total, soluble and labile Zn) were measured in 10 pairs of Zn-contaminated field-collected soils. Two approaches were studied in parallel: enzymatic activity (EA) and enzymatic stability (ES) assessed by the RSSIb, a score based on the modified Relative Soil Stability Index (RSSI) method. The enzymatic results (activity and stability) were then aggregated by various FD indexes (weighted and geometric means, Shannon, Simpson and Gini indexes) and correlated to Zn concentrations in soils to obtain the  $EC_{50}$  of these concentration-response curves. The concentration-response curves constructed from the EA weighted means were highly correlated to the labile and soluble Zn concentrations, and the  $EC_{50}$  generated from these curves were in a realistic bioavailable Zn range as compared to other studies. The aggregated ES showed Zn-sensitivity similar to the aggregated EA. Therefore, although the use of the ES approach was judicious for long-term Zn contamination, the greater resources required to assess the ES by RSSIb scores does not seem justified.

## 5.4. Introduction

Bridging activity and diversity—two major categories of microbial indicators—led to a recent, distinct and holistic methodology in soil microbial ecology known as *microbial functional diversity* (FD) (Caldwell, 2005; Bastida et al., 2008). Soil FD is a key driver of biogeochemical processes and services and may be better suited than structural/taxonomic diversity to study the microbial roles of soils (Marinari et al., 2013). Currently, soil microbial FD is mainly assessed by the bacterial community level physiological profile (CLPP) and the pollution-induced community tolerance (PICT) methods, which are both based on the assimilation rate of many carbon substrates. For example, the number of substrates that could be metabolized in a PICT study (i.e. functional diversity indicator) was higher in uncontaminated soils than in Zn-contaminated field soils (Lock & Janssen, 2005). However, their protocols require microbial extraction and cultivation, which constitutes only a very small part of the entire microbial community, and other biogeochemical cycles such as sulfur, phosphorus and nitrogen cycles are not taken into account. These two factors constitute important limits that impede the methods' widespread use (Epelde et al., 2008; Deng, 2012).

Alternatively, recent studies aggregated the responses of many soil enzymatic activities (EA). An enzyme-based aggregated FD index provides many advantages because soil enzymes are mainly produced by the indigenous microbial community, cover all the biogeochemical cycles and may be measured easily and relatively economically (German et al., 2011; Burns et al., 2013). Soil enzymes are prerequisites of carbon and nutrient decomposition, which regulates energy supplies as an overall biogeochemical steady state (Burns et al., 2013) and may be viewed as a powerful integrative biological indicator of soil health and pollutant toxicity, provided that several soil enzymes are measured (Epelde et al., 2008).

Various enzymatic FD indexes were used in past studies. One of the most prevalent categories is associated with the aggregation of the classic enzymatic responses by the FD indexes conventionally used in structural diversity. The Shannon index was mainly used (Tscherko et al., 2003; Epelde et al., 2008; Rodríguez-Loinaz et al., 2008; Marinari et al., 2012; Pignataro et al., 2012), but the Simpson and Gini indexes were also reported (Pignataro et al., 2012; Marinari et al., 2013). Other authors used multiple linear regressions, including many enzymes as

independent variables (Puglisi et al., 2006; Bastida et al., 2008). The main issue of this approach is the lack of flexibility of the proposed equation. Indeed, to be applicable, the methodology must be identical (i.e. same enzymes tested, same experimental conditions, etc.), and the unit of the enzymatic results must be converted before the multiple linear regressions are usable, which is not always simple (Bastida et al., 2008). Overall enzymatic mean equations such as geometric mean constitute another alternative with great potential but are rarely used (Hinojosa et al., 2004a; García-Ruiz et al., 2008). The weighted mean, which likely generates the most simple and intuitive aggregated index, was used in some plant FD studies based on the functional traits approach (Garnier et al., 2004) but, to the authors' knowledge, it has never been tested for enzymatic FD studies.

Focusing on a metallic contamination context, many studies showed that individual soil enzymes were metal-sensitive in spiked soils (Chaperon & Sauvé, 2007; Speir et al., 2007a; Coppolecchia et al., 2011). However, assessing the ecotoxic effect of metals with conventional microbial indicators may not be suitable for long-term field-contaminated soils. Indeed, after medium- to long-term exposure, a soil microbial community could develop metal tolerance mechanisms through genetic adaptation or physiological acclimation (Tobor-Kapłon et al., 2006a; Ruyters et al., 2012; Pereira e Silva et al., 2013). A potential outcome of this scenario is that ecotoxicological thresholds such as  $EC_{50}$  (i.e. metal concentration affecting 50% of the maximum enzymatic results) obtained from a concentration-response relationship may be higher than those obtained from a freshly contaminated ecosystem in which no tolerance mechanisms have been developed (Brandt et al.; Davis et al., 2004; Lock & Janssen, 2005; Vangheluwe et al., 2007). A higher  $EC_{50}$  suggests that tolerant ecosystems are healthier and less vulnerable than those that were not previously polluted, although tolerance mechanisms may conceal an unstable system when faced with additional stresses (Rusk et al., 2004).

In this particular case, subjecting a long-term metal-contaminated ecosystem to an additional stressor and monitoring its functional stability may constitute an alternative approach to assess the effect of metals on soil microbial community in long-term contaminated soils. Recently, a new soil enzymatic stability (ES) score known as RSSIb and based on the Relative soil stability index (RSSI) method (Bécaert et al., 2006; Dussault et al., 2008) was developed by (Lessard et al., 2013b). The score showed a good concentration-response relationship using the labile Zn

concentration of 20 Zn-contaminated field soils. It may be interesting to aggregate the individual RSSIb scores using one of the FD indexes introduced earlier in order to see whether this combined ES-FD approach is relevant to the metal ecotoxicity assessment of field-collected soils.

The aim of this study was to determine whether an enzyme-based functional diversity index is a suitable ecotoxicological indicator of long-term Zn contamination in field-collected soils. Aggregated FD indexes were calculated using mean indexes (geometric and weighted means) and other conventional structural diversity indexes (Shannon, Simpson and Gini indexes). Two enzyme-aggregated approaches were tested in parallel: the classic enzymatic activity approach and the enzymatic stability approach based on the RSSIb scores. These aggregated enzymatic diversity indexes were correlated to the soil Zn concentrations in order to obtain and compare the resulting  $EC_{50}$ . Finally, the most Zn-sensitive FD index and most relevant enzyme-aggregated approach were determined. Zinc was selected because mono-contaminated field soils at various Zn concentrations were easily collectable and because Zn is an essential metal at low concentration that generates toxic effects at high concentrations (Smolders et al., 2003).

## **5.5. Materials and methods**

### **5.5.1. Soil sampling and physicochemical analyses**

Pairs of Zn-contaminated soils from the province of Québec (Canada) were collected under galvanized pylons (top soils at 0-15 cm) and sieved in the field to  $< 2$  mm. Of these pairs, ten were selected according to the physicochemical similarity of the contaminated soil as compared to its reference soil. Field-moist sieved soils were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  in Zn-free plastic covered boxes. Total metals content (Al, Mn, Co, Ba, Ni, Cu, Pb, Cd, Zn) was extracted by  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-HF}$  total digestion (Csuros & Csuros, 2002) and analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Varian ICP-820M, Montréal, QC, Canada). The total soluble Zn and labile Zn fractions were extracted by 0.01M  $\text{KNO}_3$  solution (1:2 soil-solution ratio, extra pure grade  $\text{KNO}_3$  chemical) (Stephan et al., 2008). Part of the filtered sample was acidified to 2% (v/v) with  $\text{HNO}_3$  (environmental grade), and the acidified sample concentration was analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry to measure the total soluble metal concentration (ICP-MS, Varian 820-MS, Montréal, QC, Canada). The other part of the filtered sample was immediately (i.e. on the same day) analyzed by square wave anodic stripping voltammetry to

measure the labile Zn soil concentration (SW-ASV, polarographic stand VA663 of Metrohm and voltammeter 100B of Bioanalytical System, Québec, QC, Canada). The minimum and normalized electrolytic 0.01M KNO<sub>3</sub> soil solution sample was required for the voltammetric measurements (Stephan et al., 2008). The standard curve for the labile Zn concentration measurement was based on the standard Zn addition method in a pure 0.01 M KNO<sub>3</sub> solution.

## 5.5.2. Assessment of enzymatic approaches

### 5.5.2.1. *Conventional enzymatic activity*

The short-term enzymatic activity (EA) of six (6) hydrolases was analyzed for each soil: arylsulfatase (EC 3.1.6.1), phosphatase (EC 3.1.3.2), protease (EC 3.4.21.92), urease (EC 3.5.1.5),  $\beta$ -glucosidase (EC3.2.1.21) and invertase (EC3.2.1.48) (NC-IUBMB, 1992). The enzymes were selected to cover the main biogeochemical cycles of soils (S, P, N and C cycles). All the soil samples for the enzymatic assays were incubated in H<sub>2</sub>O. The EA of each soil sample was analyzed in triplicate in addition to duplicate controls (soil samples for which the substrate was added only after the 2-h incubation). Detailed enzymatic assay procedures of arylsulfatase (S-cycle), phosphatase (P-cycle), protease (N-cycle) and urease (N-cycle) are described in Lessard et al. (2013a). The  $\beta$ -glucosidase activity was measured by mixing 1 g of soil with 4 ml of deionized water and 1 ml of 25 mM disodium-p-nitrophenyl- $\beta$ -D glucopyranoside as substrate. The soil slurry of this enzyme was incubated for 2 h at 37°C, and the enzymatic reaction was stopped by adding 1 ml of 0.5 M CaCl<sub>2</sub> and 4 ml of 0.5 M NaOH. The soil slurry was centrifuged at 20 000 g for 5 min, and the supernatant was quantitatively transferred to a microplate well. The absorbance was read at 420 nm against the blank with a multifunction microplate reader (GENios, Tecan, Montréal, QC, Canada) (Schinner et al., 1996). The invertase activity was measured by mixing 0.5 g of soil with 1.5 ml of deionized water and 1.5 ml of 35 mM sucrose as substrate. The soil slurry of this enzyme was incubated for 2 h at 50°C. After the incubation, the samples were diluted by adding 87 ml of distilled water. The soil slurries were centrifuged at 20 000 g for 5 min, and the supernatant was treated with three reagents (potassium cyanide, potassium hexacyanoferrate(III) and ferric ammonium sulfate reagents) in order to form a blue complex of ferric hexacyanoferrate (II). The absorbance was read at 690 nm against the blank with a multifunction microplate reader (Schinner et al., 1996).



### 5.5.2.2. *Enzymatic stability*

The enzymatic stability was assessed by calculating the RSSIb score based on the time-integrated ES method developed by (Bécaert et al., 2006) and modified by (Lessard et al., 2013b) in order to consider contamination history within the score. The RSSIb score is the area under the curve of the EA recovery over time of the contaminated soil disturbed by a heat pulse at 60°C for 24 h divided by the area under the curve of the EA recovery over time of the reference undisturbed soil (Figure 5.5-1). The interpretation is straightforward: a rising RSSIb score indicates that the soil enzyme is increasingly stable.

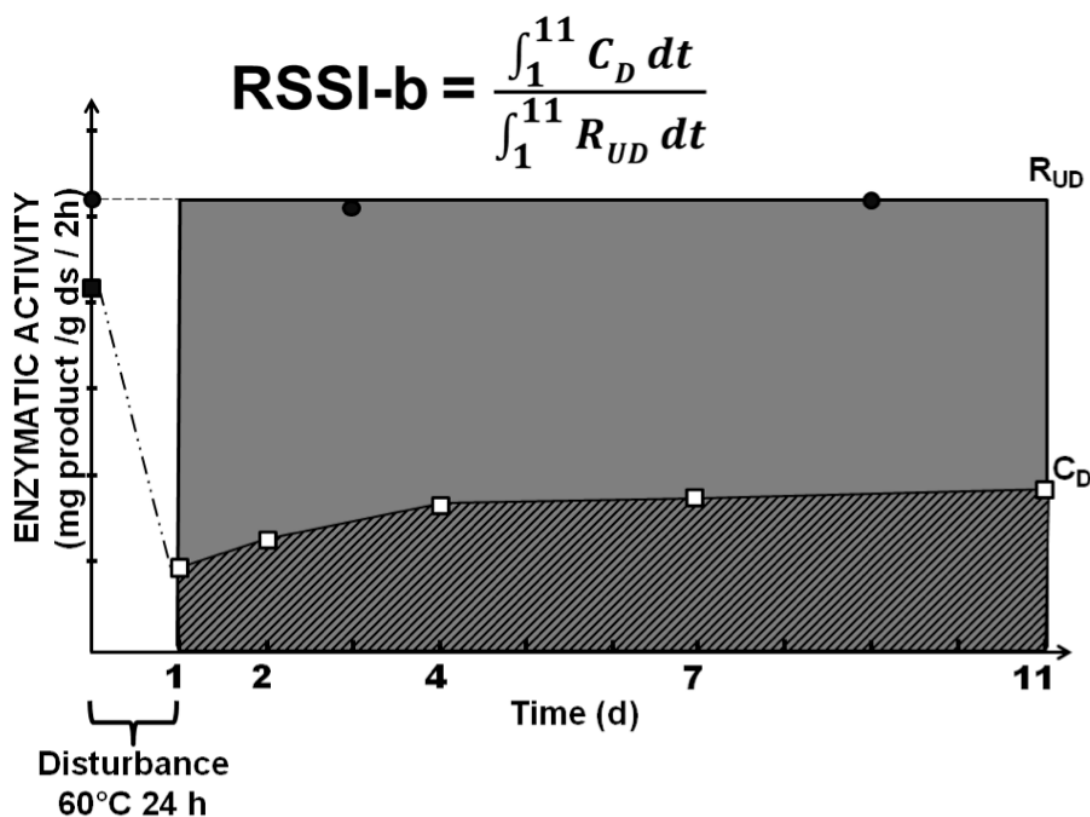


Figure 5.5-1 : Schematic example of the calculation of the RSSI-b score from areas under EA curves over time. The lined area and the white-filled squares are related to the contaminated disturbed ( $C_D$ ) soil, and the gray area and the black-filled circles are the reference undisturbed soil ( $R_{UD}$ ). The ds acronym within the y-axis unit refers to dry soil.

### 5.5.3. Aggregation of enzymatic responses

The aggregated soil enzymatic response was calculated by a weighted and a geometric mean and by the conventional FD indexes listed earlier. The FD indexes are summarized in Table 5.5-1. Since the EA units vary widely among soil enzymes, the EAs of every enzyme were normalized before being summed up by dividing the individual EAs of each contaminated soil and the individual EA of its paired reference soil. The aggregated FD indexes are equivalent in terms of reducing the 6 enzymatic variables into one. Therefore, a principal component analysis (PCA) was carried out in parallel to validate whether the total variance of the dataset is mostly explained by a single principal component (PC) —whether the proportion of the variance of the first PC was high as compared to the variances of the other PCs. It was also verified whether Cronbach's  $\alpha$  coefficient was higher than  $\alpha=0.7$ , which corresponds to the acceptability threshold of the internal consistency of the enzyme dataset (Scherrer, 2009). Once validated, the eigenvectors of the first PC were used as weights for each soil enzyme in the weighted mean index. Intrinsically, the geometric mean and other conventional FD indexes were not weighted using the eigenvectors of the first PC. In parallel, other FD indexes were calculated by substituting the % EA by the RSSIb scores in order to compare the enzymatic approaches. Statistical tests were conducted using JMP 9.0.0 software (SAS Institute Inc.).

Table 5.5-1: Calculated enzyme-based functional diversity indexes

FD index	Interpretation	General equation	Based on EA	Based on ES	Details related to the FD indexes
Weighted mean (WM) (Garnier et al., 2004)	High WM index means high FD	$\frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot y_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$	$\frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (\%EA)_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$	$\frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot RSSIb_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$	<p><math>i</math> is a soil enzyme  <math>n</math> is the total number of soil enzymes</p> <p><math>\%EA = (EA_C/EA_R) \times 100</math>            where <math>EA_C</math> is the EA of the contaminated soil and <math>EA_R</math> is the EA of the reference soil</p> <p><math>w_i</math> is the weight of each soil enzyme:  <math>w_i = \frac{v_i}{\sum_{i=1}^n v_i}</math> where <math>v</math> is the eigenvector of the 1<sup>st</sup> PC</p> <p><math>RSSIb = \frac{\int_1^{11} c_D(t)dt}{\int_1^{11} RUD(t)dt}</math> (see Figure 1)</p> <p><math>q_i</math> refers to the cumulative frequency value of the Lorenz curve (<math>EA_i &lt; EA_{i+1}</math> or <math>RSSIb_i &lt; RSSIb_{i+1}</math>)</p>
Geometric mean (GM) (Hinojosa et al., 2004b)	High GM index means high FD	$\left( \prod_{i=1}^n y_i \right)^{1/n}$	$\left( \prod_{i=1}^n \%EA_i \right)^{1/n}$	$\left( \prod_{i=1}^n RSSIb_i \right)^{1/n}$	
Shannon (Epelde et al., 2008)	High Shannon index means high FD	$-\sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i$	$p_i = \frac{\%EA_i}{\sum_{i=1}^n \%EA_i}$	$p_i = \frac{RSSIb_i}{\sum_{i=1}^n RSSIb_i}$	
Simpson-Yule (Pignataro et al., 2012)	High Simpson index means high FD	$\frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$	$p_i = \frac{\%EA_i}{\sum_{i=1}^n \%EA_i}$	$p_i = \frac{RSSIb_i}{\sum_{i=1}^n RSSIb_i}$	
Gini (Marinari et al., 2013)	Low Gini index means high FD; bounded between 0 and 1	$\frac{2}{n} \sum_{i=1}^n q_i - \left( \frac{n+1}{n} \right)$	$q_i = \frac{i \cdot \%EA_i}{\sum_{i=1}^n \%EA_i}$	$q_i = \frac{i \cdot RSSIb_i}{\sum_{i=1}^n RSSIb_i}$	

#### 5.5.4. Concentration-response curves from aggregated enzyme FD indexes

The ten aggregated FD indexes were plotted against the three soil Zn concentration measurements (total, soluble and labile). From these regressions, the coefficient of determination  $R^2$  and the  $EC_{50}$  toxicity threshold were recorded in order to quantify the regression strength and identify the most sensitive models. Two mathematical enzymatic inhibition hyperbolic models (partial and total) were tested in order to determine the model that best fits the enzymatic FS results. The difference between these two models is that the partial inhibition model reaches an asymptote parallel above the x-axis (i.e. enzymatic responses are never fully inhibited), whereas the total inhibition model implies that there is no background enzymatic activity at high contaminant concentrations (Speir et al., 1995; Moreno et al., 2001). The equation and  $EC_{50}$  of the hyperbolic partial inhibition model are  $y = \frac{c \cdot (1 + a \cdot \exp(x))}{(1 + b \cdot \exp(x))}$  and  $EC_{50} = \frac{(1 - a/b)}{(b - a)}$  and those of the hyperbolic total inhibition are  $y = c(1 + b \cdot \exp(x))$  and  $EC_{50} = 1/b$ . The parameters  $a$ ,  $b$  and  $c$  depend on several enzymatic inhibitions but must always be  $> 0$  and  $b > a$ . The independent variable  $x$  is the ln-transformed metal concentration. The widely known sigmoidal logistic model was not tested because it is based on empirical modeling rather than a mechanistic approach and because it yielded similar  $EC_{50}$  values as compared to the hyperbolic total inhibition models (Moreno et al., 2001; Coppolecchia et al., 2011). The curve fitting for these non-linear regressions was conducted with CurveExpert Professional 1.5.0 software.

## 5.6. Results

### 5.6.1. Soil physicochemical and enzymatic characterization

The enzymatic results and Zn fraction of the 10 pairs of Zn-contaminated field-collected soils are reported in Table 5.6-1. Enzymatic activity results and units varied widely among soils and thus needed to be normalized by the reference uncontaminated soil before being further aggregated. The field-collected soils showed geological background levels for total concentrations of Al, Mn, Co, Ba, Ni, Cu, Pb and Cd. The total Zn concentration varied from background levels for reference soils to well above the industrial land use threshold for contaminated soils ( $>1500 \text{ mg}$  of total  $\text{Zn} \cdot \text{kg}^{-1}$  of dry soil), according to Québec's generic soil protection criteria (MDDEP, 1998). For all the pairs of soils, total, soluble and labile Zn concentrations were significantly

higher in the contaminated soil as compared to its paired reference soil. The labile Zn concentration was well correlated to the soluble Zn concentration in soils ( $R^2 = 0.99$ , equation:  $[\text{labile Zn}] = 0.99 \cdot [\text{soluble Zn}] - 0.06$ ), while total Zn concentration was poorly correlated to labile and soluble Zn concentration ( $R^2 = 0.07$  and  $R^2 = 0.06$ , respectively).

Table 5.6-1: Main statistical information related to enzymatic activities and Zn fractions of the 10 pairs of Zn-contaminated field soils

		Aryl µg PNP/g ds/2h	Phos µg PNP/g ds/2h	Prot µg tyr/g ds/2h	Ure µg AMM/g ds/2h	Gluco µg PNP/g ds/2h	Inv µg EG /g ds /2h	Total Zn content (mg/kg)	Soluble Zn content (mg/L)	Labile Zn content (mg/L)
<b>Contaminated n=10</b>	<b>Mean</b>	226	1100	641	100	1092	2059	2383	15.72	15.545
	<b>SD</b>	340	1144	817	108	1522	2323	2554	13.81	13.799
	<b>Maximum</b>	1360	4469	3114	389	6498	9960	9179	37.49	36.902
	<b>Minimum</b>	0	230	46	5	39	342	413	0.08	0.023
<b>Reference n=10</b>	<b>Mean</b>	236	1042	542	98	894	1663	92	92.01	92.007
	<b>SD</b>	216	690	520	59	965	1092	130	129.68	129.676
	<b>Maximum</b>	945	2800	2347	219	4209	5181	413	412.91	412.911
	<b>Minimum</b>	39	452	120	17	153	4	2	2.27	2.274

SD = standard deviation, ds = dry soil, PNP = pnitrophenol, Tyr= tyrosine, AMM = ammonium, EG = equivalent glucose, Aryl = arylsulfatase, Phos = phosphatase, Prot = protease, Ure = urease, Gluco =  $\beta$ -glucosidase, Inv =invertase.

### 5.6.2. Aggregation of enzymatic responses

It is statistically suitable to aggregate the enzymatic results by calculating a weighted or geometric mean based on EA and ES approaches. Indeed, the scree plot of the PCA, a useful schematic representation of the eigenvalues distribution over PCs, showed that 83% and 75% of the EA and ES variance respectively – calculated from the eigenvalues of each PC – was associated with the PC1 (Figure 5.6-1). Furthermore, the proportion of the variance plummeted at the second PC and made a gradual decline for the next PCs, illustrating a clear elbow indicating that only the first component accounted for the meaningful variance of the PCA. Cronbach's  $\alpha$  coefficient was 0.94 and 0.88 for the EA and ES approaches, respectively, indicating that the internal consistency was excellent.

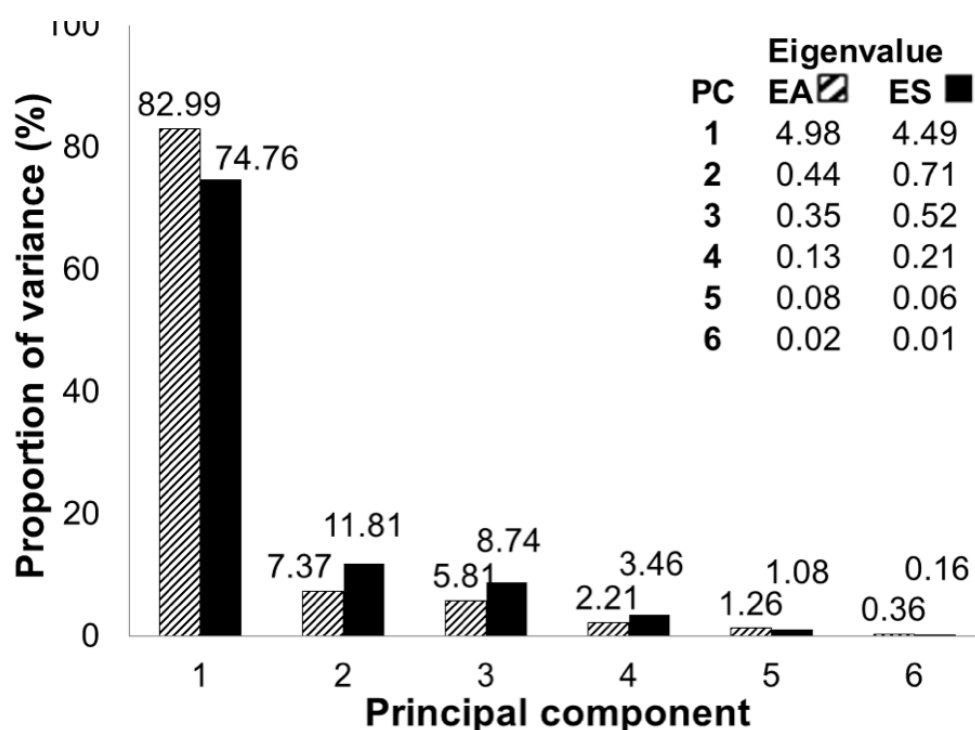


Figure 5.6-1 : Scree plot illustrating the distribution of the variance over the principal components (PC). In the upper right corner, the eigenvalue of each PC is given by enzymatic approach. Legend: Lined bars are related to the enzymatic activity approach and black-filled bars are related to the enzymatic stability approach.

Weight  $w_i$  of the enzymes in the weighted average equation were calculated from the eigenvectors  $v_i$  of the first PC (Table 5.6-2). The weight of the enzymes was quasi-equivalent using the EA approach, with a slightly lower influence of arylsulfatase and phosphatase. Conversely, the weight of the enzymes varied using the ES approach:  $\beta$ -glucosidase = urease = protease > arylsulfatase  $\approx$  phosphatase > invertase. The weighted average index calculation accounted for the fluctuating weights. The FD index values based on means were more widespread than other conventional FD indexes (Table 5.6-3). For example, using the EA approach, the weighted and geometric mean values varied between 39.90 and 178.67 and 37.88 and 175.26, respectively, whereas the Shannon, Simpson and Gini indexes varied between 0.71 and 0.78, 4.71 and 5.93 and 0.06 and 0.26, respectively. For both approaches, many soils had the same Shannon and Gini index values.

Table 5.6-2: Eigenvectors  $v$  and weights  $w$  of each enzyme  $i$  associated with the first principal component for both enzymatic approaches

	EA		ES	
	Eigenvector $v_i$ of PC1	Weight $w_i$	Eigenvector $v_i$ of PC1	Weight $w_i$
<b>Arylsulfatase</b>	0.38	0.15	0.40	0.16
<b>Protease</b>	0.43	0.17	0.45	0.18
<b>Phosphatase</b>	0.38	0.16	0.38	0.16
<b>Urease</b>	0.41	0.17	0.45	0.18
<b><math>\beta</math>-glucosidase</b>	0.42	0.17	0.45	0.19
<b>Invertase</b>	0.43	0.17	0.30	0.12
<b>Sum</b>	2.45	1.00	2.43	1.00



Table 5.6-3: Enzymatic aggregated indexes calculated per soil by the EA and ES approaches

Soil ID	Weighted mean	Geometric mean	Shannon	Simpson	Gini	Weighted mean	Geometric mean	Shannon	Simpson	Gini
	Conventional enzymatic activity					Enzymatic stability by RSSIb score				
Rawdon	$0.43 \pm 0.14$	$0.39 \pm 0.12$	$0.73 \pm 0.01$	$4.71 \pm 0.03$	$0.26 \pm 0.02$	$0.27 \pm 0.07$	$0.21 \pm 0.04$	$0.65 \pm 0.02$	$3.58 \pm 0.21$	$0.41 \pm 0.03$
Chateauguay	$1.79 \pm 0.22$	$1.75 \pm 0.21$	$0.77 \pm 0.01$	$5.71 \pm 0.06$	$0.12 \pm 0.01$	$1.13 \pm 0.06$	$1.06 \pm 0.05$	$0.75 \pm 0.01$	$5.26 \pm 0.02$	$0.20 \pm 0.01$
Baie Comeau	$1.10 \pm 0.22$	$1.02 \pm 0.21$	$0.75 \pm 0.01$	$5.34 \pm 0.04$	$0.20 \pm 0.01$	$0.54 \pm 0.09$	$0.52 \pm 0.14$	$0.75 \pm 0.03$	$5.37 \pm 0.41$	$0.18 \pm 0.07$
St-Simeon	$0.51 \pm 0.11$	$0.38 \pm 0.18$	$0.71 \pm 0.02$	$4.92 \pm 0.13$	$0.24 \pm 0.01$	$0.29 \pm 0.05$	$0.28 \pm 0.06$	$0.75 \pm 0.02$	$5.37 \pm 0.25$	$0.19 \pm 0.04$
Baie St-Paul	$0.52 \pm 0.13$	$0.49 \pm 0.12$	$0.74 \pm 0.01$	$5.18 \pm 0.14$	$0.22 \pm 0.01$	$0.31 \pm 0.06$	$0.29 \pm 0.07$	$0.74 \pm 0.03$	$5.11 \pm 0.46$	$0.24 \pm 0.07$
St-Jean-Matha	$0.89 \pm 0.18$	$0.88 \pm 0.20$	$0.77 \pm 0.01$	$5.76 \pm 0.24$	$0.11 \pm 0.05$	$0.33 \pm 0.07$	$0.29 \pm 0.16$	$0.72 \pm 0.05$	$4.76 \pm 0.55$	$0.30 \pm 0.09$
Chomedey	$0.97 \pm 0.24$	$0.93 \pm 0.20$	$0.76 \pm 0.01$	$5.53 \pm 0.37$	$0.26 \pm 0.05$	$0.63 \pm 0.07$	$0.56 \pm 0.06$	$0.69 \pm 0.01$	$3.99 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.01$
Lac St-Henri	$0.40 \pm 0.13$	$0.34 \pm 0.12$	$0.72 \pm 0.01$	$4.92 \pm 0.09$	$0.26 \pm 0.01$	$0.18 \pm 0.04$	$0.15 \pm 0.03$	$0.68 \pm 0.01$	$4.06 \pm 0.04$	$0.36 \pm 0.01$
St-Remi	$1.56 \pm 0.32$	$1.56 \pm 0.32$	$0.78 \pm 0.01$	$5.93 \pm 0.04$	$0.06 \pm 0.01$	$0.94 \pm 0.09$	$0.90 \pm 0.09$	$0.74 \pm 0.01$	$5.17 \pm 0.06$	$0.22 \pm 0.01$
St-Jean	$1.25 \pm 0.19$	$1.21 \pm 0.20$	$0.76 \pm 0.01$	$5.60 \pm 0.19$	$0.15 \pm 0.05$	$0.84 \pm 0.09$	$0.76 \pm 0.08$	$0.74 \pm 0.01$	$4.99 \pm 0.06$	$0.23 \pm 0.01$

<sup>1</sup> Zn fractions related to Zn-contaminated soils

### 5.6.3. Concentration-response curves from aggregated enzyme indexes

The weighted and geometric mean FD indexes usually generated comparable  $EC_{50}$  and  $R^2$  results for both approaches, except for the partial inhibition model of the ES approach (Table 5.6-4). The coefficients of regression  $R^2$  were higher using the EA approach than the ES approach. For all the possible scenarios, the concentration-response regressions based on soluble Zn concentration gave similar  $EC_{50}$  and  $R^2$  than those based on labile Zn concentration. The concentration-response curves based on total Zn concentrations did not yield strong regressions. The partial enzymatic inhibition model usually generated lower  $EC_{50}$  values than the total enzymatic inhibition model. However, there was not enough data at extremely high labile Zn concentrations (i.e. ln-transformed labile Zn concentration > 11) to state whether the enzymatic results reached 0 or were stabilized around an asymptotic positive value.

The other FD indexes (Shannon, Simpson and Gini) failed to assess the Zn toxicity of long-term contaminated field-collected soils on soil enzymes. Indeed, few regressions showed biologically relevant coefficients of regression (i.e.  $R^2 > 0.50$ ). Furthermore, the  $EC_{50}$  values predicted using these indexes were outside the range of the soluble and labile Zn concentrations of the collected field soils, leading to a very unstable and unsure calculation of the toxicity parameters.

Table 5.6-4: Concentration-response parameters ( $R^2$  and  $EC_{50}$ ) recorded by enzymatic approach and by type of mean aggregated index based on every enzyme or only enzymes with higher weight  $w_i$  (n=9, St-Jean excluded).  $EC_{50}$  unit is based on either the labile Zn or soluble Zn concentration.

		Enzymatic activity approach				Enzymatic stability approach			
		Partial inhibition		Total inhibition		Partial inhibition		Total inhibition	
		$EC_{50}$ (mg/L)	$R^2$	$EC_{50}$ (mg/L)	$R^2$	$EC_{50}$ (mg/L)	$R^2$	$EC_{50}$ (mg/L)	$R^2$
[labile Zn]	Weighted mean	3.15±1.23	0.75	12.50±0.87	0.74	1.80±0.26	0.71	8.52±0.29	0.65
	Geometric mean	4.74±2.22	0.78	10.36±10.36	0.77	14.22±2.14	0.58	7.94±0.22	0.63
[soluble Zn]	Weighted mean	2.88±1.18	0.78	11.57±11.57	0.77	1.19±0.22	0.74	8.68±0.26	0.70
	Geometric mean	5.25±2.86	0.81	9.24±0.60	0.81	10.81±2.08	0.64	7.08±0.20	0.67

## 5.7. Discussion

### 5.7.1. Enzymatic data fitting to obtain the EC<sub>50</sub>

The enzyme-based FD index that best assessed the long-term Zn contamination was the mean of the enzymatic activities (% C/R) of the field-collected soils. Both mean equations (weighted and geometric) were statistically valid and led to analogous toxicity thresholds since the eigenvectors of the first principal component were quasi-equivalent. However, in the potential case in which the eigenvectors (i.e. the weights of the individual enzymes) varied widely, the weighted mean should be privileged since the relative contribution of individual enzymes is taken into account. To the authors' knowledge, this is the first study to attempt to obtain ecotoxicological data such as EC<sub>50</sub> using conventional structural diversity indexes translated into FD indexes. Indeed, Epelde et al. (2008) found that the Shannon diversity index based on enzymes was significantly lower in a Zn-Pb-Cd spiked soil than its reference soil, but only one soil was tested in a comparative way. However, in this study, the conventional FD indexes failed to assess the ecotoxic impact of Zn-contaminated field soils. The calculated EC<sub>50</sub> values related to these concentration-response relationships were beyond the bioavailable Zn concentrations of the field soils, leading to a biased prediction of Zn ecotoxicity.

Using the soluble Zn concentration or the labile Zn concentration as the x-axis in the concentration-response regressions yielded similar EC<sub>50</sub> values, since both Zn fractions were quasi-equivalent. At first glance, the results contrasted with those in Stephan et al. (2008), which measured labile Zn concentrations that were, on average, six times lower than a soluble Zn concentration for 66 Zn-contaminated field soils ( $R^2 = 0.96$ , equation:  $[\text{labile Zn}] = 0.17 \cdot [\text{soluble Zn}] + 0.01$ , 2 data excluded). The difference may be explained by the standard curve of the current study, which was prepared on a pure 0.01 M KNO<sub>3</sub> solution instead of a soil solution sample of uncontaminated soil extracted with a 0.01 M KNO<sub>3</sub> solution. Nevertheless, although the measured labile Zn concentrations may be overestimated in this study, the two Zn concentrations were highly correlated in both studies. These observations suggest that it may be not necessary to measure the labile Zn concentration in soils since the values may be calculated from the labile Zn vs. soluble Zn regression and since concentration-response curves based on soluble Zn concentrations yielded strong regressions.

It was impossible to determine the best fitting model because the labile Zn concentration range did not cover extreme Zn concentrations, despite the efforts to collect highly Zn-contaminated field soils (e.g. Lac St-Henri and St-Remi soils). This significantly influenced the EC<sub>50</sub> calculation. For example, the EC<sub>50</sub> data calculated using the partial inhibition model were two to seven times lower than those obtained using the total inhibition model (Table 5.6-4). This behaviour stems from the asymptote of the minimum EA resulting from the partial inhibition (Pignataro et al., 2012). Renella et al. (2003) suggested that the partial inhibition model could be more suitable to study enzyme kinetics in heterogeneous systems such as soils than total inhibition or even the empirical logistic model since soil constituents can protect soil hydrolases and prevent full enzymatic inhibition. Moreover, the R<sup>2</sup> were slightly higher using the partial inhibition model. This was also observed by Hinojosa et al. (2008). However, some studies reported that modeling enzyme kinetics with a partial inhibition model was impossible because the enzymatic asymptote showed a negative value or low R<sup>2</sup> (Moreno et al., 2001; Coppolecchia et al., 2011). Future work should elucidate enzymatic behaviour by focusing on field soils with extremely high bioavailable metal concentrations.

The enzymatic FD index calculated from a weighted mean and based on the ES approach was consistent and slightly more protective than the classic EA approach. However, the global soil enzymatic activity remained Zn-sensitive in the long-term. Hinojosa et al. (2004b) also found that the global soil hydrolases activity (i.e. geometric mean of arylsulfatase, urease,  $\beta$ -glucosidase, acid and alkaline phosphatase activity) was significantly lower in long-term Cd-Cu-Zn-contaminated field soils than in the uncontaminated reference soils. These results suggest that the persistence of metal, which is likely to induce physiological acclimation or genetic adaptation (Mertens et al., 2010; Ruyters et al., 2012), did not necessarily reduce overall enzyme sensitivity to metals. Hence, the greater technical and financial resources required to assess ES do not seem justified as compared to classic EA assessment since both approaches led to closely associated results.

#### 5.7.2. Comparison of the EC<sub>50</sub> with the literature

Comparing the EC<sub>50</sub> data in this study with the literature was challenging and arduous. Indeed, most of the studies related to metal effects on various soil organisms used correlations and other statistical analyses to assess metal toxicity, but a small fraction generated ecotoxicological data.

By refining this fraction to solely focus on Zn and EC<sub>50</sub> data and excluding the EC<sub>50</sub> generated from total Zn concentration, the number of studies related to bioavailable Zn effect on various soil organisms was drastically reduced. Of these studies, two used field contaminated soils (Posthuma & Notenboom, 1996; Shu et al., 2002) and three generated EC<sub>50</sub> for individual soil enzymes (Chaperon & Sauvé, 2007; Speir et al., 2007a; Coppolecchia et al., 2011). None generated ecotoxicological data from the metal effect on aggregated soil enzymatic response (Table 5.6-1). Since the studies used different models, the EC<sub>50</sub> generated from logistic and polynomial models may be approximately compared to the EC<sub>50</sub> in this study generated by the hyperbolic total inhibition model. Only data in this study related to the weighted mean are reported in the Table 5.7-1.

By first considering the enzymatic data in Table 5.7-1, an overall EA data of the current study was equivalent to the Zn effect on individual urease activity (Case A: line #1 compared to line #9). For other soil enzyme studies, data from these study were two to four times more sensitive (Case C: line #3 compared to lines #7 to #11, except line #9) or 12 to 400 times less sensitive (i.e. higher EC<sub>50</sub> data) than arylsulfatase and urease (Case D: line #4 compared to lines #5, #12 and #13). The high variability indicates that the soil spiking preparation, and perhaps the fact that individual enzymatic results are compared to overall enzymatic results, considerably affects the Zn toxicity results for soil enzymes. Unfortunately, it is impossible to compare enzymatic data obtained from field studies to data in this study.

When the enzymatic data in this study were compared to other microbial indicators, the overall EA was some three times more sensitive than other microbial activities related to the N-cycles (line #4 compared to lines #14 and #15) but was intermediately sensitive to microbial biomass (line #4 compared to lines #16 to #18). When other trophic levels were considered, the data in the current study were similar to those in invertebrate and plant studies (lines #3 and #4 compared to lines #19 to #22). Interestingly, the two field-contaminated soil studies assessing the Zn effect on invertebrates and indigenous plants (lines #19 and #21) showed more closely associated toxicity results to the current study. These eclectic data demonstrate the difficulty of finding comparable trends in data and the importance of using field contaminated soils (German et al., 2011). Nevertheless, the EC<sub>50</sub> of the current study are in a realistic toxicity range of bioavailable Zn

concentrations in soils and are likely the most representative and holistic enzymatic ecotoxicological data available for Zn.

Table 5.7-1: EC<sub>50</sub> data related to Zn toxicity in various soil organisms. Only those obtained from labile and soluble Zn fractions are recorded. The second column refers to four cases in which the EC<sub>50</sub> values may be associated and compared (e.g. line #1 with lines #6 and #9). Some EC<sub>50</sub> were recalculated to be expressed in terms of mg·L<sup>-1</sup> in order to allow study comparisons.

Line	Case	Category	Biological indicator	EC <sub>50</sub>	Unit	Zn fraction	Fit model	Soil or media	Reference
1	A	MA	Weighted mean of EA	3	mg/L	Labile	Partial	Field soils	This study
2	B	MA	Weighted mean of EA	3	mg/L	Soluble	Partial	Field soils	This study
3	C	MA	Weighted mean of EA	13	mg/L	Labile	Total	Field soils	This study
4	D	MA	Weighted mean of EA	12	mg/L	Soluble	Total	Field soils	This study
5	D	MA	Arylsulfatase	1	mg/L	Soluble	Logistic	Spiked soils aged from 1 to 6 years	(Speir et al., 2007a)
6	A	MA	Arylsulfatase	ND	mg/L	Labile CaCl <sub>2</sub>	Partial	Spiked leached soils	(Coppolecchia et al., 2011)
7	C	MA	Arylsulfatase	26	mg/L	Labile CaCl <sub>2</sub>	Total	Spiked leached soils	(Coppolecchia et al., 2011)
8	C	MA	Arylsulfatase	26	mg/L	Labile CaCl <sub>2</sub>	Logistic	Spiked leached soils	(Coppolecchia et al., 2011)
9	A	MA	Urease	4	mg/L	Labile CaCl <sub>2</sub>	Partial	Spiked leached soils	(Coppolecchia et al., 2011)
10	C	MA	Urease	52	mg/L	Labile CaCl <sub>2</sub>	Total	Spiked leached soils	(Coppolecchia et al., 2011)
11	C	MA	Urease	55	mg/L	Labile CaCl <sub>2</sub>	Logistic	Spiked leached soils	(Coppolecchia et al., 2011)
12	D	MA	Urease	0.003	mg/L	Soluble	Logistic	Spiked soil #1 aged soil 30 days	(Chaperon & Sauvé, 2007)
13	D	MA	Urease	0.166	mg/L	Soluble	Logistic	Spiked soil #2 aged soil 30 days	(Chaperon & Sauvé, 2007)
14	D	MA	N <sub>2</sub> -fixation	39	mg/L	Soluble	Polynomial	Spiked Leonard jars	(Zhang et al., 1998)
15	D	MA	Potential Nitrification Rate	30	mg/L	Soluble	Logistic	Spiked soils aged 12 months	(Ruyters et al., 2010)
16	D	MB	Bioluminescence <i>E. coli</i>	6	mg/L	Soluble	Logistic	Amended soils with sewage sludge	(Chaudri et al., 1999)
17	D	MB	Rhizobia colony number	639	mg/L	Soluble	Polynomial	Spiked Leonard jars	(Zhang et al., 1998)
18	D	MB	Nodulation with Rhizobia	116	mg/L	Soluble	Polynomial	Spiked Leonard jars	(Zhang et al., 1998)
19	C	Invertebrate	Earthworm Reproduction	18	mg/L	Labile CaCl <sub>2</sub>	Logistic	Field soils	(Posthuma & Notenboom, 1996)
20	D	Invertebrate	Springtail Reproduction	17	mg/L	Soluble	Logistic	Spiked soils	(Kool et al., 2011)
21	D	Plants	Graminea	2-18	mg/L	Soluble	Logistic	Field soils and field plants species	(Shu et al., 2002)
22	D	Plants	Acacia Biomass	18	mg/L	Soluble	Polynomial	Spiked Leonard jars	(Zhang et al., 1998)

MA = Microbial activity, MB = microbial biomass or population, Labile CaCl<sub>2</sub> = labile Zn extracted by a CaCl<sub>2</sub> solution, ND = Not determined



### 5.7.3. Choice of soil enzymes in the FD index

It is important to underline an important step in the experimental design of the enzymatic FD methodology proposed in this study: the choice of soil enzymes. The most prevalent enzymes that are reported to be sensitive to metals and cover the main biogeochemical cycles (C, P, N and S) were selected because their activity reflects the soil capacity to protect and stabilize enzymes and depicts the long-term steady state of soil enzymatic activity (Knight & Dick, 2004). In the authors' opinion, it is also important to measure more than one enzyme per biogeochemical cycle whenever possible in order to be able to generalize the enzymatic FD methodology proposed in the current study to other contamination contexts. Indeed, the impact of a metal on soil enzymes –individual or aggregated– could be site- or metal-specific. For example, some studies observed that urease was affected by metals (Chaperon & Sauvé, 2007; Moreno et al., 2009), while others reported urease as insensitive or stimulated by Zn (Renella et al., 2004; Li et al., 2009). The same conclusions can be drawn for other enzymes, meaning that it is not suitable or relevant to choose one or several individual enzyme(s) to assess metal toxicity. Hence, aggregating the response of many soil enzymes covering the main biogeochemical cycles at least twice leads to the derivation of more reliable  $EC_{50}$  values and provides a more robust overview of metal toxicity in soil FD, especially when an enzyme is insensitive to the pollutant (Bastida et al., 2008; Marinari et al., 2012; Pignataro et al., 2012). Future works should elucidate the impact of the choice of soil enzyme on the calculation of the enzymatic FD index.

## 5.8. Conclusion

This is the first extensive study of several Zn-contaminated field soils to 1) generate  $EC_{50}$  values from a functional diversity methodology based on the aggregation of soil enzymatic responses and 2) elucidate the long term metal contamination implications on the combined ES-FD approach. Functional diversity indexes based on a weighted or geometric mean of enzymatic responses were better suited to this study than other conventional FD indexes such as the Shannon index. Concentration-response curves based on soluble Zn concentration produced results with parameters similar to those based on labile Zn concentration, suggesting that measuring the soluble Zn concentrations of field-contaminated soils is sufficient for the Zn ecotoxic assessment of enzymatic FD. More research is needed to select the model that best fits

the enzymatic data since it has a substantial impact on the toxicity threshold (i.e.  $EC_{50}$ ) calculation. Furthermore, despite the fact that certain Zn tolerance mechanisms likely altered the soil microbial community over time, this study showed that soil enzyme functional diversity based on enzymatic activity remains quite sensitive to Zn even after a long-term field-contamination. Incorporating the functional stability concept into the aggregated enzyme FD index was judicious but did not provide any additional information on the enzymatic toxicity of Zn.

## 5.9. Supporting information

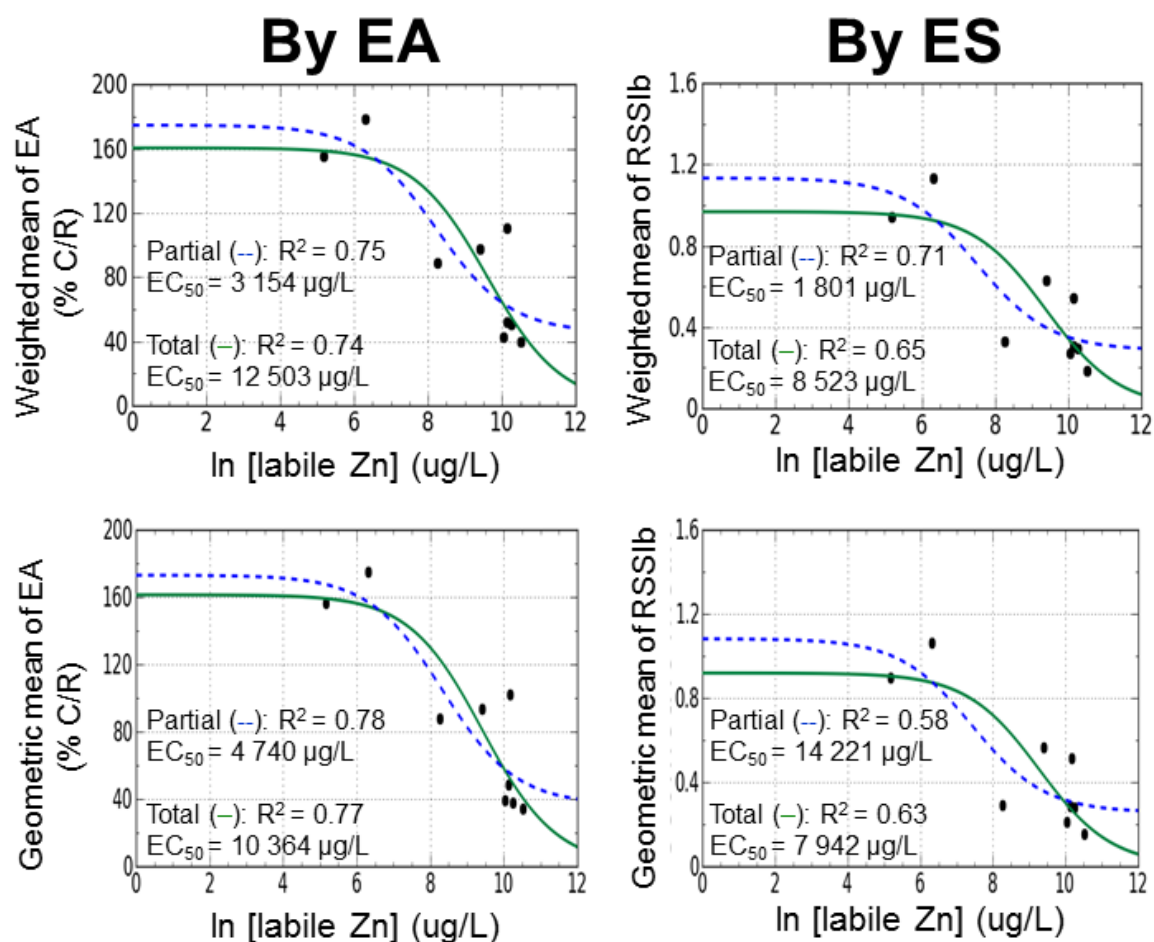


Figure 5.9-1 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$  and  $EC_{50}$ ) from weighted and geometric means aggregated enzyme indexes using labile Zn concentration. Left column is related to the conventional enzymatic activity approach and right column is related to the enzymatic stability approach. Dashed line is the partial enzymatic inhibition model and solid line is the total enzymatic inhibition model ( $n=9$ , St-Jean soil excluded).

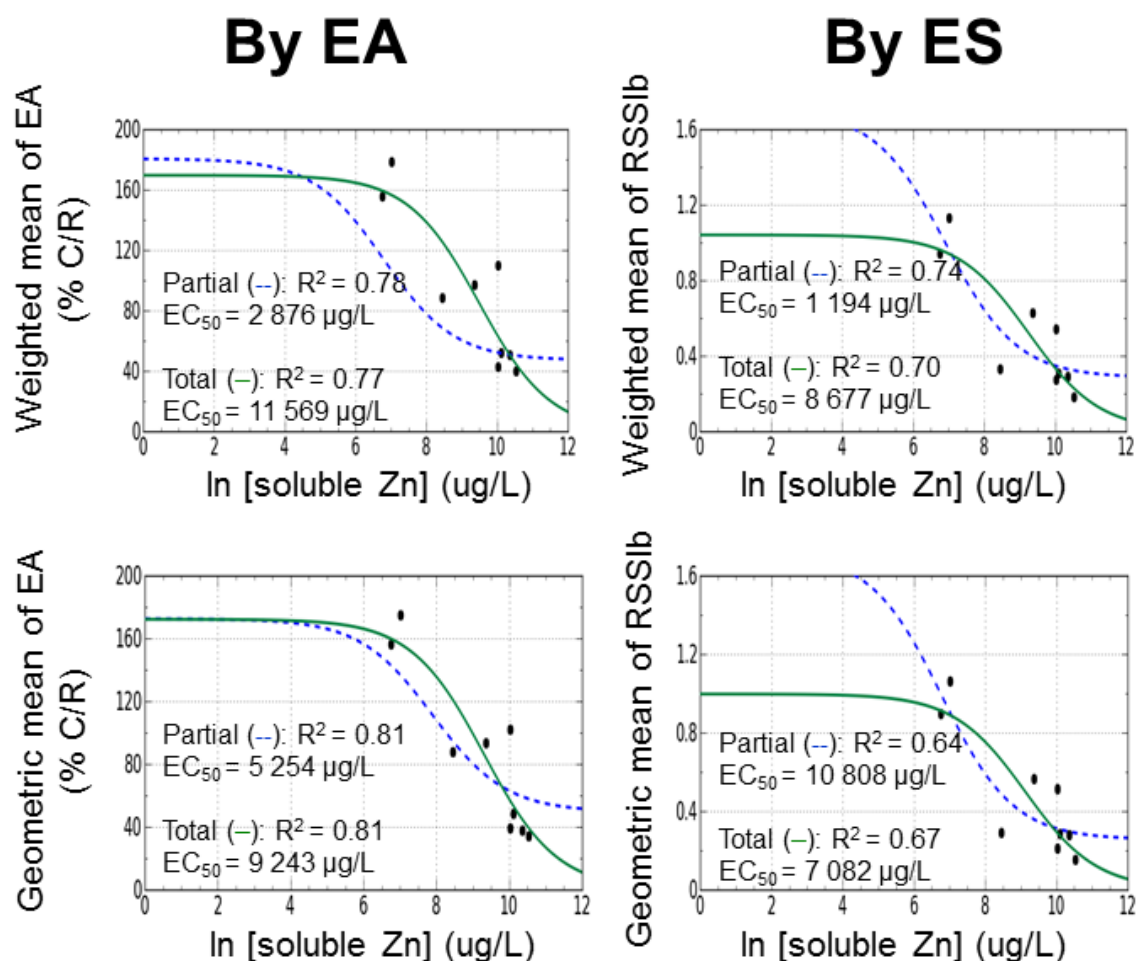


Figure 5.9-2 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$  and  $EC_{50}$ ) from weighted and geometric means aggregated enzyme indexes using soluble Zn concentration ( $n=9$ , St-Jean soil excluded).

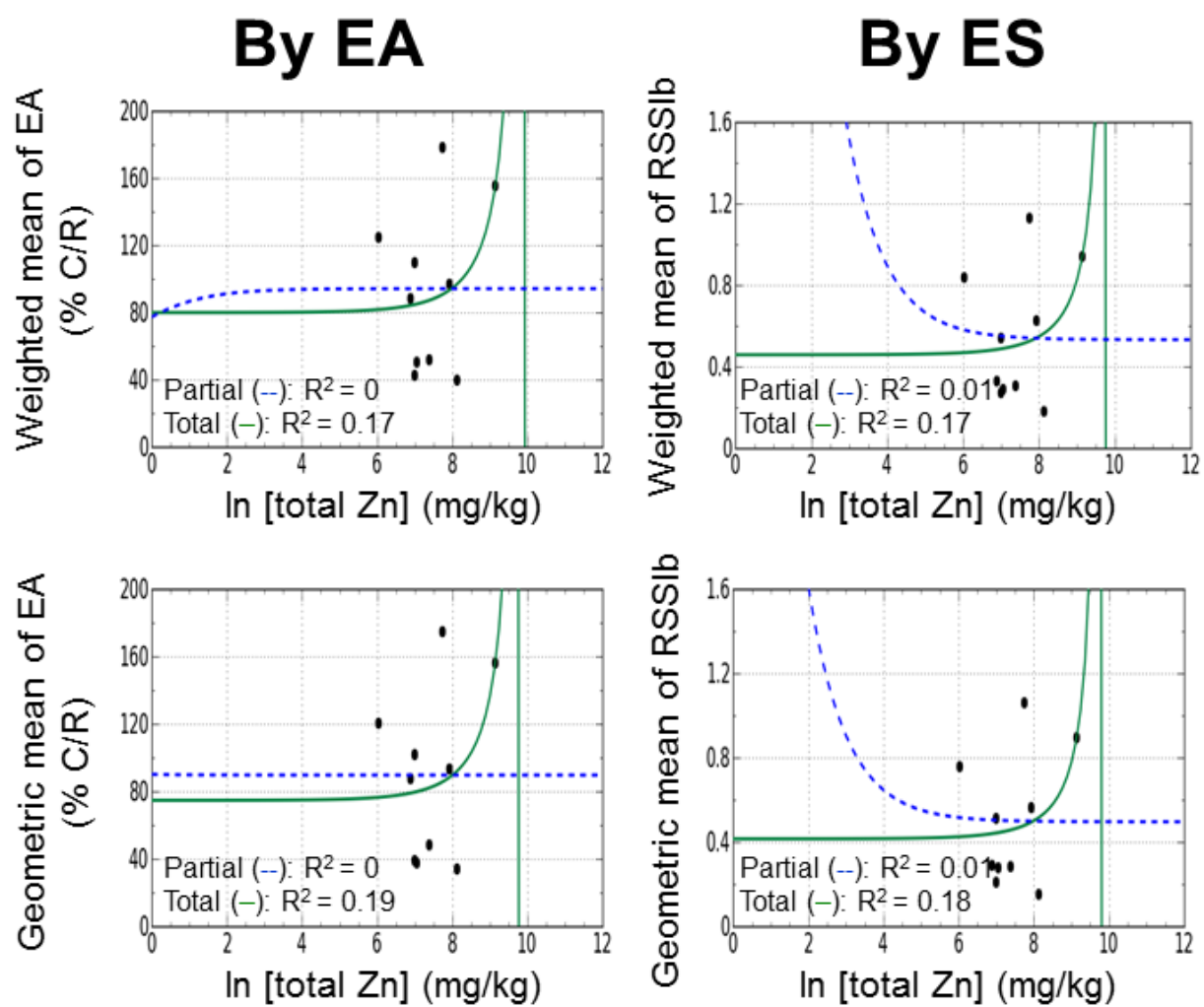


Figure 5.9-3 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$  and  $EC_{50}$ ) from weighted and geometric means aggregated enzyme indexes using total Zn concentration.

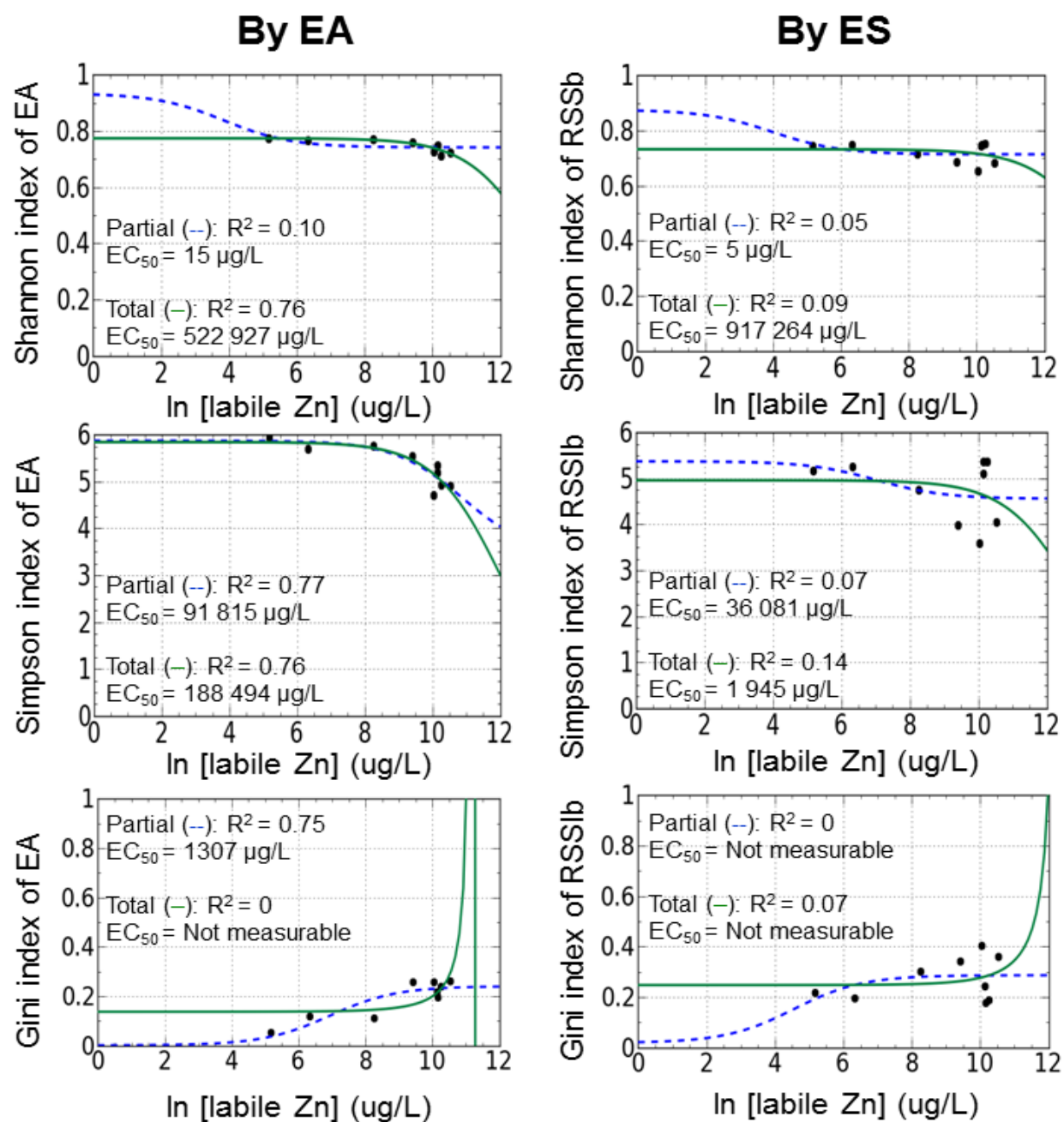


Figure 5.9-4 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$  and  $EC_{50}$ ) from conventional diversity indexes using labile Zn concentration ( $n=9$ , St-Jean soil excluded).

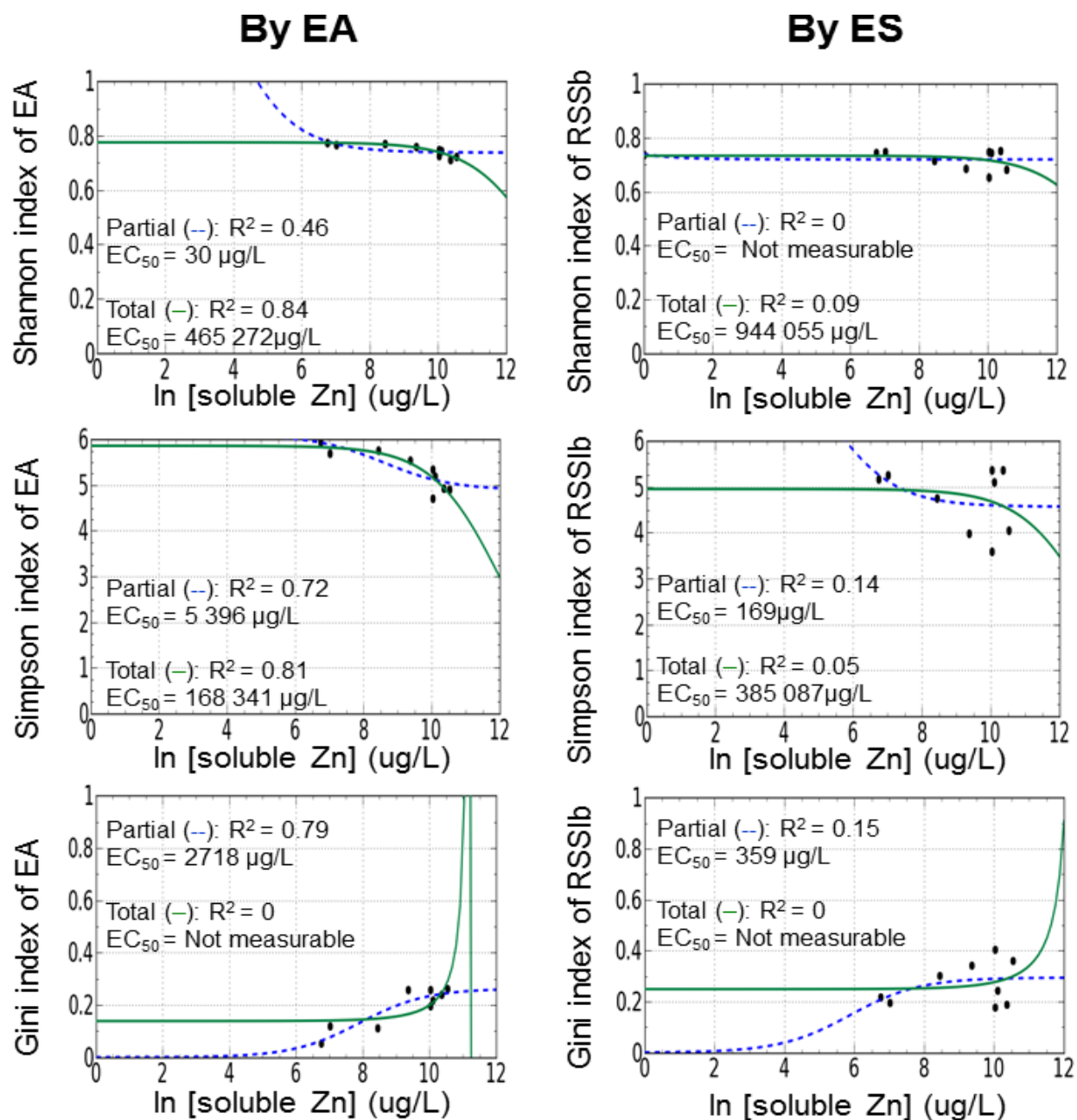


Figure 5.9-5 : Concentration-response regressions and parameters ( $R^2$  and  $EC_{50}$ ) from conventional diversity indexes using soluble Zn concentration ( $n=9$ , St-Jean soil excluded).

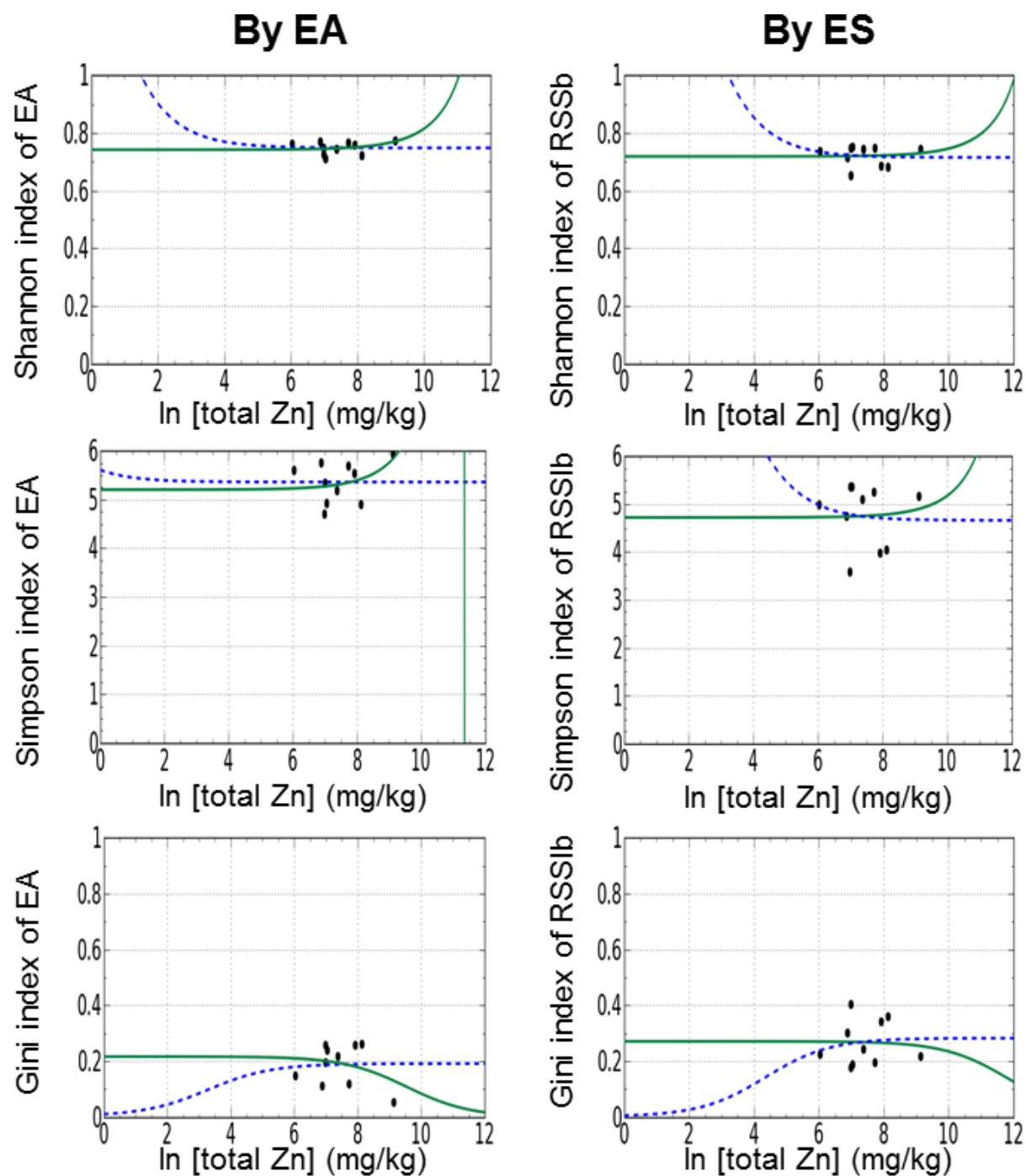


Figure 5.9-6 : Concentration-response regressions from conventional diversity indexes using total Zn concentration.



## CHAPITRE 6. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Cette section regroupe quelques résultats supplémentaires non présentés dans les chapitres précédents mais qui appuient les observations et idées véhiculées dans les trois manuscrits.

### 6.1. Comparaison de l'activité enzymatique tampon vs eau pour de nouvelles enzymes

Cette section est un complément du chapitre 3. Le Tableau 6.1-1 renferme d'autres régressions linéaires des résultats d'activité enzymatique conduits dans le tampon en fonction de ceux conduits dans l'eau qui n'ont pas été présentées dans le premier manuscrit. Ces régressions avaient été exclues du premier manuscrit car les nouvelles enzymes (phosphatase alcaline,  $\beta$ -glucosidase et invertase) avaient été analysées sur seulement la moitié des 20 sols identifiés dans ce manuscrit. Elles sont cependant ici ajoutées comme résultats complémentaires car elles permettent d'élucider si la divergence des résultats enzymatiques tampon vs eau est due au pH du tampon ou à sa composition chimique.

Tableau 6.1-1 : Régressions linéaires liant l'activité enzymatique conduite dans le tampon à celle conduite dans l'eau pour chaque enzyme

Tampon	Tampon	Équation	R <sup>2</sup>	AE plus ↑ dans
Arylsulfatase	Acétate pH 5,8	$AE_T = 61,1 + 1,12AE_E^{***}$	0,89	Tampon
Protéase	TRIS pH 8,1	$AE_T = -32,1 + 1,41AE_E^{***}$	0,92	Tampon
Phosphatase acide	TUA pH 6,5	$AE_T = -1,56 + 0,81AE_E^{***}$	0,97	Eau
Phosphatase alcaline	TUA pH 11	$AE_T = -179 + 0,774AE_E^{***}$	0,68	Eau
$\beta$ -Glucosidase	TUA pH 6	$AE_T = -33,1 + 0,69AE_E^{***}$	0,96	Eau

Invertase	Acétate pH 5,5	$AE_T = -245^{**} + 0,726AE_E^{***}$	0,97	Eau
Uréase	Borate pH 10	$AE_T = 12,67 + 0,36AE_E^{***}$	0,66	Eau

Niveau de significativité: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

$AE_T$  ou  $AE_E$  = activité enzymatique conduite dans le tampon ou dans l'eau

TUA = tampon universel acide, TRIS = tris-hydroxyméthyl-aminométhane

Le Tableau 6.1-1 montre trois points importants. Tout d'abord, deux enzymes, la phosphatase alcaline et l'uréase, ont un coefficient de régression  $R^2$  plus faible que les autres. Ces enzymes ont toutes deux un tampon à pH alcalin (pH 11 et pH 10 respectivement). De plus, trois enzymes utilisent le même tampon standard (TUA) mais à différents pH: la phosphatase acide (pH 6,5), la phosphatase alcaline (pH 11) et la  $\beta$ -glucosidase (pH 6). Or, les résultats de la phosphatase acide et de la  $\beta$ -glucosidase conduits dans le tampon TUA sont bien corrélés à ceux conduits dans l'eau ( $R^2 = 0,97$  et  $R^2 = 0,96$  respectivement), alors que cette corrélation est beaucoup moins forte pour la phosphatase alcaline ( $R^2 = 0,68$ ). Ces résultats soutiennent l'idée que c'est davantage le pH alcalin des tampons qui biaise les résultats enzymatiques qu'une quelconque interaction (bio)chimique entre le tampon, le sol, les métaux du sol et les enzymes. De plus, les résultats des essais conduits dans l'eau étaient majoritairement plus élevés que ceux conduits dans le tampon standard pour 5 des 7 enzymes testées, ce qui est très étonnant puisque les tampons sont supposés générer des résultats enzymatiques optimaux.

## 6.2. Démarche comparative pour évaluer la santé d'un sol par stabilité fonctionnelle

Les résultats supplémentaires présentés dans cette section donnent un complément d'information au 2<sup>e</sup> manuscrit présenté dans le chapitre 4 montrant l'échec de la démarche comparative traditionnellement employée lors de l'évaluation de la santé d'un sol par une approche de stabilité. Dans les ouvrages de SF de la dernière décennie, la stabilité fonctionnelle était évaluée de façon comparative : on comparait la SF d'un sol stressé – par une utilisation agricole ou forestière des terres ou par une contamination – à la SF d'un sol sain non stressé (c.-à-d. un sol de référence). Plusieurs auteurs ont montré par un test de comparaison de moyennes que leurs sols sains avaient un score de SF plus élevé que les sols stressés (Griffiths et al., 2005; Tobor-Kaplon et al., 2006a; Zhao et al., 2010; Zhang et al., 2013). Cette même démarche a donc été exécutée

sur les sols testés dans le 2<sup>e</sup> manuscrit afin de voir si les scores SE testés (Bécaert, Zhang, Griffiths, Chaer et O&W) arrivaient à discriminer un sol contaminé au Zn de son sol de référence (Tableau 6.2-1).

Tableau 6.2-1 : Score de SF relatif au sol contaminé comparé à celui du sol de référence pour chaque paire de sols. Différents scénarios de significativité basés sur un test de Student sont présentés: 1) Différence non significative (NS) 2) Score du sol contaminé plus grand que celui du sol de référence ( $C > R$ ) et 3) Score du sol de référence plus grand que celui du sol contaminé ( $C < R$ ). Le premier nombre correspond aux nombres de paires de sols et celui entre parenthèse équivaut au % de paires de sols de la case sur le nombre total de paires de sols par ligne ( $p < 0,05$  pour tous les scénarios significatifs).

Enzyme	Score SF	NS	$C > R$	$C < R$
Arylsulfatase	Bécaert RSSI	6 (30%)	13 (65%)	1 (5%)
	Zhang	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
	Griffith	0 (0%)	6 (30%)	14 (70%)
	Chaer	0 (0%)	13 (55%)	7 (45%)
	Orwin & Wardle	13 (65%)	4 (20%)	3 (15%)
Protéase	Bécaert RSSI	9 (45%)	5 (25%)	6 (30%)
	Zhang	17 (85%)	3 (15%)	0 (0%)
	Griffith	3 (15%)	8 (40%)	9 (45%)
	Chaer	0 (0%)	9 (45%)	11 (55%)
	Orwin & Wardle	8 (40%)	6 (30%)	6 (30%)
Phosphatase	Bécaert RSSI	4 (20%)	10 (50%)	6 (30%)
	Zhang	19 (95%)	1 (5%)	0 (0%)
	Griffith	0 (0%)	10 (50%)	10 (50%)
	Chaer	1 (5%)	12 (60%)	7 (35%)
	Orwin & Wardle	12 (60%)	2 (10%)	6 (30%)

Uréase	Bécaert RSSI	8 (40%)	6 (30%)	6 (30%)
	Zhang	16 (80%)	3 (15%)	1 (5%)
	Griffith	0 (0%)	8 (40%)	12 (60%)
	Chaer	0 (0%)	10 (50%)	10 (50%)
	Orwin & Wardle	3 (15%)	14 (70%)	3 (15%)
Toutes enzymes combinées	Bécaert RSSI	27 (34%)	34 (42%)	19 (24%)
	Zhang	72 (90%)	7 (9%)	1 (1%)
	Griffith	3 (4%)	32 (40%)	45 (56%)
	Chaer	1 (1%)	44 (55%)	35(44%)
	Orwin & Wardle	36 (45%)	26 (33%)	18 (22%)

Ce tableau montre qu'aucun des scores SF n'a départagé efficacement les sols contaminés de leur sol de référence, sauf peut-être le score 'Griffiths' si on considère que 70% des paires de sol, pour lesquelles le score SF relatif à l'arylsulfatase est plus élevé dans le sol de référence que dans le sol contaminé (catégorie  $C < R$ ), est satisfaisant. Pour les autres enzymes, ce même score est cependant moins impressionnant (60% pour l'uréase, 50% pour la phosphatase, 45% pour la protéase et 56% globalement) et le pourcentage des autres scores associés à toutes les autres enzymes est encore plus faible. Plusieurs sols contaminés ne sont pas significativement différents de leur sol de référence, alors que les autres paires de sols sont classées de façon aléatoire et inconsistante dans les catégories  $C > R$  ou  $C < R$ . Par conséquent, la démarche comparative traditionnellement employée pour dissocier un sol sain d'un sol contaminé par la stabilité fonctionnelle n'est pas fiable.

### 6.3. Influence des propriétés physico-chimiques sur les indices DF

Dans le troisième manuscrit (chapitre 5), l'influence des propriétés physico-chimiques sur les indices DF enzymatiques n'a pas été présentée afin que le lecteur reste focalisé sur l'objectif écotoxicologique de l'étude. Les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) basée sur la matrice de corrélations (afin de standardiser les covariances des différentes variables de dimensions hétérogènes) et de l'analyse des corrélations  $r$  de Pearson associés à ce sujet sont donc présentés dans la Figure 6.3-1 et le Tableau 6.3-1 respectivement. Ces analyses statistiques incluaient plusieurs variables telles que les indices FD des deux approches enzymatiques (activité et stabilité), les trois fractions de Zn (totale, soluble et labile) et les autres propriétés physico-chimiques du sol. Les indices Shannon, Simpson et Gini n'ont pas été inclus dans ces analyses puisque le chapitre 5 a montré qu'ils n'étaient pas fiables.

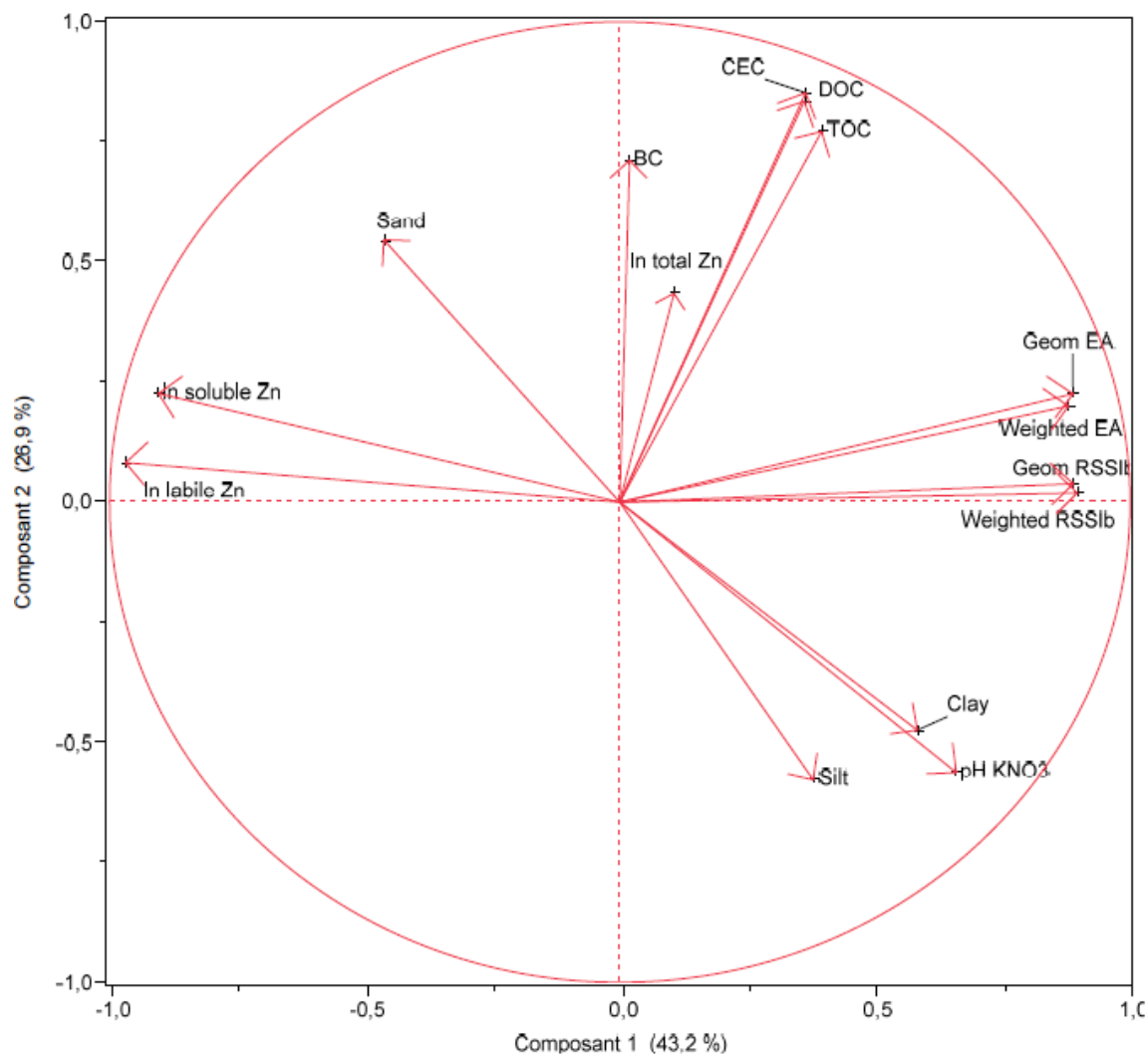


Figure 6.3-1 : Graphique bidimensionnel des deux composantes principales illustrant les vecteurs des indices DF associés aux deux approches enzymatiques et les propriétés physico-chimiques des sols (Légende : BC = capacité tampon, DOC = carbone organique dissout, COT = carbone organique total, Geom = moyenne géométrique, Weighted = moyenne pondérée, EA = approche par activité enzymatique, RSSI = approche par stabilité enzymatique,  $\ln x$  = concentration  $x$  de Zn transformée par son logarithme naturel)

Tableau 6.3-1 : Coefficients de corrélation  $r$  de Pearson avec les moyennes DF enzymatiques et les propriétés physico-chimiques des sols. Les colonnes associées aux autres fractions de Zn et autres propriétés physico-chimiques ont été omises pour focaliser seulement sur les indices DF.

	<b>Weighted EA</b>	<b>Geom EA</b>	<b>Weighted RSSIb</b>	<b>Geom RSSIb</b>
<b>Weighted EA</b>	1,00	1,00	0,97	0,97
<b>Geom EA</b>	1,00	1,00	0,96	0,96
<b>Weighted RSSIb</b>	0,97	0,96	1,00	1,00
<b>Geom RSSIb</b>	0,97	0,96	1,00	1,00
<b>Sand</b>	-0,02	-0,03	-0,09	-0,07
<b>Silt</b>	-0,05	-0,04	0,02	0,00
<b>Clay</b>	0,13	0,15	0,21	0,19
<b>pH KNO<sub>3</sub></b>	0,53	0,52	0,70	0,69
<b>CEC</b>	0,35	0,39	0,23	0,25
<b>BC</b>	-0,10	-0,05	-0,24	-0,24
<b>TOC</b>	0,33	0,36	0,15	0,16
<b>DOC</b>	0,37	0,40	0,18	0,19
<b>ln labile Zn</b>	-0,76	-0,77	-0,79	-0,78
<b>ln soluble Zn</b>	-0,70	-0,70	-0,75	-0,74
<b>ln total Zn</b>	0,24	0,25	0,23	0,25

Légende : BC = capacité tampon, DOC = carbone organique dissout, COT = carbone organique total, Geom = moyenne géométrique, Weighted = moyenne pondérée, EA = approche par activité enzymatique, RSSI = approche par stabilité enzymatique, ln x = concentration x de Zn transformée par son logarithme naturel

D'après la Figure 6.3-1 et le Tableau 6.3-1, quelques corrélations méritent d'être soulignées. Concernant l'approche DF classique basée sur l'activité des enzymes du sol, les vecteurs propres associés aux moyennes enzymatiques sont presque anti-parallèles à ceux associés aux concentrations de Zn soluble et labile, signifiant qu'ils sont fortement négativement corrélés. Cependant, ces moyennes enzymatiques sont légèrement corrélées à quelques autres propriétés physico-chimiques du sol (notamment pH, DOC, CEC et TOC) puisque les vecteurs impliqués ne sont pas complètement parallèles ou perpendiculaires et que les coefficients  $r$  de Pearson ont des valeurs intermédiaires oscillant entre 0,33 à 0,53 pour ces propriétés. Concernant l'approche DF basée sur la stabilité enzymatique par l'agrégation des scores RSSIb des six enzymes, les moyennes enzymatiques sont très fortement négativement corrélées aux concentrations biodisponibles du Zn. Cependant, elles sont plus corrélées au pH du sol que l'activité enzymatique agrégée, mais elles ne sont pas du tout corrélées à la matière organique (total ou

dissoute) et aux autres propriétés physico-chimiques du sol. Cette analyse est consistante avec celle présentée dans le deuxième manuscrit (chapitre 4), où les scores RSSIb non agrégés avaient été corrélés par ACP aux fractions de Zn et autres propriétés du sol.

Ces observations signifient que les indices DF basés sur les deux approches sont bien corrélés aux concentrations biodisponibles du Zn, mais que quelques propriétés physico-chimiques ont une influence sur l'indice DF agrégé, même si ces deux approches sont normalisées par le site de référence. Ces influences tierces constituent une difficulté inhérente aux expériences conduites sur des sols collectés sur le terrain pour lesquelles de nombreuses variables ne sont pas contrôlées. Malgré cette variabilité intrinsèque, il est nécessaire que la recherche utilisant des conditions *in situ* s'accroisse en écotoxicologie afin de représenter de façon plus réaliste les écosystèmes.

## CHAPITRE 7. DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce chapitre souligne les forces et les limites de la méthodologie écotoxicologique développée durant les travaux de doctorat et énonce plusieurs perspectives et recommandations qui pourraient être mises en œuvre suite à ce projet.

### 7.1. Forces

L'indice enzymatique agrégé (moyenne pondérée des activités enzymatiques individuelles du sol) utilisé dans cette thèse a permis de produire une donnée écotoxique  $EC_{50}$  robuste englobant l'effet à long-terme du Zn sur la diversité fonctionnelle enzymatique de la communauté microbienne des sols collectés sur le terrain. Tel que mentionné dans le chapitre 5, la donnée  $EC_{50}$  générée est probablement la plus représentative et la plus holistique qui existe dans la littérature. En effet, elle inclut des conditions *in situ* et des données empiriques de par l'utilisation de l'eau lors des essais enzymatiques et de par l'échantillonnage de sols contaminés (German et al., 2011). Elle tient aussi compte des particularités des métaux, soit leur spéciation et biodisponibilité, la teneur de fond métallique du site échantillonné, le vieillissement naturel de la contamination à long-terme et la possible mise en place de mécanismes de tolérance suite à la contamination persistante du Zn (Giller et al., 2009). Elle repose en plus sur les réactions biogéochimiques de sols réalisées par la communauté microbienne indigène des sols (Burns et al., 2013). Tous ces aspects méthodologiques répondent aux principales lacunes écotoxicologiques soulevées dans la section 1.1.4.

Un autre point fort de la méthodologie présentée est l'agrégation des résultats enzymatiques conduisant à un indice de diversité fonctionnelle, un des attributs microbiens de pertinence écologique très promus actuellement dans la littérature scientifique (Garbisu et al., 2011). Les attributs de pertinence écologique sont des indicateurs holistiques et universels de la santé/qualité d'un écosystème: 1) vigueur ou productivité, 2) organisation ou diversité (fonctionnelle et structurelle), 3) Stabilité ou résilience dans des contextes multi-stresses, 4) capacité suppressive des maladies et 5) redondance des espèces. Ces attributs quantifiables sont issus de l'analyse des bénéfices que les humains retirent des écosystèmes (c.-à-d. les services écosystémiques) (Mooney



et al., 2009). La recherche actuelle en écologie est à un point tournant où l'approche traditionnelle unidisciplinaire sur-spécialisée est progressivement délaissée au profit d'indicateurs intégrateurs et interdisciplinaires (Zell & Hubbart, 2013). Par exemple, en écologie microbienne, les études portent de plus en plus sur la diversité fonctionnelle et structurelle et sur la stabilité fonctionnelle que sur des indicateurs spécifiques non intégrés et considérés séparément comme la nitrification, la biomasse microbienne ou l'activité individuelle des enzymes (Pereira e Silva et al., 2013). La méthodologie écotoxicologique basée sur la diversité fonctionnelle enzymatique présentée dans cette thèse s'inscrit donc parfaitement dans cette nouvelle vague d'indicateurs universels. Les possibilités émergentes de ce projet sont nombreuses et sont décrites dans la section 7.3.

## 7.2. Limites

La méthodologie présentée dans ce projet contient néanmoins quelques limites. Par exemple, l'incorporation de la donnée écotoxique  $EC_{50}$  produite dans le cadre de ce projet dans le calcul du facteur effet relatif à l'écotoxicité terrestre (section 1.1.3) n'a pas été testée. Cette étape sera plus laborieuse qu'elle ne le semble et pourrait faire l'objet d'un projet de maîtrise. En effet, vu la grande hétérogénéité des données  $EC_{50}$  du Zn disponibles, il y aura un travail considérable de triage et d'analyse de sensibilité à faire pour identifier les catégories de données potentiellement influentes, comme les  $EC_{50}$  obtenues de sols collectés sur le terrain ou de concentrations biodisponibles de Zn (Owsianiak et al., 2013). Il faudrait aussi trouver une façon de valider si cette  $HC50_{EC50}$  représente mieux l'impact potentiel du Zn sur les écosystèmes terrestres, ce qui constitue un défi intrinsèque à tous les projets de recherche portant sur l'amélioration des facteurs de caractérisation en ÉICV.

Une limite additionnelle au projet repose sur l'impossibilité de modéliser la zone d'essentialité du Zn car il n'y avait pas suffisamment de paires de sols ayant une concentration de Zn labile faible. Bien qu'il aurait été intéressant de modéliser cette zone dans les courbes concentration-réponse présentées dans le 3<sup>e</sup> manuscrit (chapitre 5), cela n'affecte pas en soi les données  $EC_{50}$  extraites de ces courbes. En effet, les réponses enzymatiques associées aux concentrations de Zn labile inférieures à la concentration associée à la valeur maximale de l'indice de diversité fonctionnelle

enzymatique ne sont pas utilisées pour le calcul des  $EC_{50}$  (Kefford et al., 2008). Une autre limite de la méthodologie présentée est la grande variabilité intrinsèque des données de terrain. Néanmoins, l'analyse statistique des sols utilisés dans ce projet a conduit à des résultats réalistes ayant une pertinence biologique et une significativité acceptable ( $R^2 > 0,50$  et  $p < 0,05$ ) (Wallenstein & Hall, 2012; Zell & Hubbart, 2013).

Un défi considérable lié aux suites de ce projet porte sur la recherche de sol de terrains contaminés par un seul métal incluant des sols de référence ayant les mêmes propriétés physico-chimiques. Pour pallier à cette problématique d'accès à des sols mono-contaminés, il serait possible de se tourner vers des contaminations métalliques mixtes de terrain. L'interprétation des résultats serait plus complexe mais l'échantillonnage des sols serait beaucoup plus simple car de nombreux sols voisins des mines, fonderies ou autres activités industrielles ont une contamination métallique mixte et les sols de référence sont disponibles. Cela permettrait aussi d'étudier l'effet toxique d'une contamination métallique mixte, un axe peu étudié à ce jour. Bien que la localisation et l'échantillonnage des sols collectés sur le terrain demeurera un véritable défi, l'analyse des sols réels est une lacune majeure en écotoxicologie, et une grande partie de la communauté scientifique souligne depuis près d'une décennie l'urgence de générer des données écotoxiques sur des sols collectés sur le terrain (Caldwell, 2005; Giller et al., 2009; Turner, 2010; German et al., 2011; Deng, 2012; Burns et al., 2013; Zell & Hubbart, 2013).

### **7.3. Perspectives et recommandations**

Les perspectives et recommandations énoncées ci-dessous représentent soit des exercices de validation de la méthodologie présentée dans cette thèse, soit des axes de recherche émergents et très opportuns liant plusieurs concepts présentés dans cette thèse.

### 7.3.1. Validation et optimisation

#### 7.3.1.1. *Incorporation de la nouvelle donnée EC<sub>50</sub> dans le calcul du facteur effet*

Tel que discuté dans la section 7.2, un projet de maîtrise subséquent devrait tester l'incorporation de la donnée écotoxique EC<sub>50</sub> produite dans le cadre de ce projet dans le calcul du facteur effet relatif à l'écotoxicité terrestre. Pour ce faire, les données écotoxiques terrestres du Zn disponibles en littérature (EC<sub>50</sub>, NOEC, LOEC) devront d'abord être répertoriées et triées dans les différentes banques de données comme ECOTOX<sup>8</sup> de l'Agence de Protection Environnementale des États-Unis US-EPA ou celle de l'Institut Nationale de l'EnviRonnement industriel et des rISques, l'INERIS<sup>9</sup>. Puisque la plupart des données écotoxiques disponibles sont basées sur la concentration totale de Zn, il faudrait voir l'impact de la conversion et combinaison de ces données à celles issues de concentration biodisponible de Zn sur le calcul de la moyenne géométrique HC50<sub>EC50</sub> terrestre du Zn. Il faudrait aussi voir si le fait de sélectionner seulement les données EC<sub>50</sub> pertinentes – c'est-à-dire des données issues de sols collectés sur le terrain et basées sur la concentration biodisponible du Zn – change significativement la concentration dangereuse HC50<sub>EC50</sub>. De plus, il faudrait vérifier si cette moyenne géométrique – incluant la nouvelle donnée EC<sub>50</sub> basée sur la diversité fonctionnelle enzymatique – doit être calculée en considérant: 1) les EC<sub>50</sub> terrestres moyens de chaque phylum ou 2) toutes les EC<sub>50</sub> terrestres disponibles confondus (Haye et al., 2007). Cette moyenne géométrique pourrait ensuite être comparée avec celle des travaux de Haye et collaborateurs (2007) pour voir si elles sont significativement différentes l'une de l'autre. Il serait également nécessaire de voir comment l'ajout/retrait des phyla semblables (par exemple les annélides et arthropodes, deux phyla d'invertébrés) affecte le calcul de la valeur HC50<sub>EC50</sub>.

#### 7.3.1.2. *Validation de la méthodologie pour d'autres métaux*

Il faudrait aussi valider que la méthodologie fonctionne sur d'autres sols contaminés par les métaux, comme les métaux divalents (Cu, Pb, Cd, Ni), et éventuellement d'autres métaux comme l'As, le Cr et le Hg. La principale difficulté repose sur l'échantillonnage des sols contaminés par

<sup>8</sup> <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>

<sup>9</sup> <http://www.ineris.fr/>

un seul contaminant métallique (section 7.2). Une option possible serait de doper des mésocosmes et d'y laisser vieillir la contamination dans des conditions réelles (à l'extérieur) afin d'analyser les sols dans quelques années. Il faudrait cependant qu'un centre de recherche prenne en charge cette étape.

#### 7.3.1.3. *Validation de la méthodologie pour d'autres contaminants organiques persistants*

Il serait aussi intéressant de vérifier si la méthodologie proposée dans cette thèse est applicable à des polluants organiques persistants, comme les composés organo-halogénés utilisés comme pesticides ou retardateurs de flamme, ou les composés organo-métalliques utilisés comme catalyseurs. Encore ici, la problématique principale serait de trouver des sols de terrains contaminés par ces contaminants (échantillonnés par exemple près des usines produisant ces composés). L'avènement des nanoparticules (métallique ou autre) génère aussi un nouvel axe de recherche écotoxicologique et la méthodologie écotoxicologique développée dans cette thèse pourrait être utilisée pour évaluer l'effet toxique de ces contaminants organiques persistants.

#### 7.3.1.4. *Optimisation des essais enzymatiques*

Les essais enzymatiques réalisés durant ce projet reposaient sur des méthodes spectrophotométriques. Cependant, depuis quelques années, les méthodes fluorométriques ont grandement évolué et évaluent maintenant rapidement et sensiblement l'activité d'enzymes couvrant les cycles du phosphore, du carbone et de l'azote (Burns et al., 2013). Il faudrait comparer la sensibilité de ces méthodes aux essais spectrophotométriques pour voir 1) si les résultats concordent et 2) s'il y a un gain de temps et une économie d'argent à utiliser les méthodes fluorométriques. Il faut noter cependant que les enzymes liées au cycle du soufre ne sont présentement pas évaluées par ces méthodes. De plus, il faudrait réaliser une analyse de sensibilité sur le choix des enzymes dans le calcul de l'indice de diversité fonctionnelle enzymatique. Il serait finalement intéressant de réaliser les essais enzymatiques en intégrant d'autres conditions expérimentales plus réalistes (comme une température d'incubation plus près de celle observée sur le terrain) afin de voir si la diversité fonctionnelle enzymatique serait tout aussi sensible au Zn avec de nouvelles conditions expérimentales plus réalistes (Turner, 2010; German et al., 2011).

### 7.3.2. Ouverture et futurs axes de recherche

Les attributs de pertinence écologique sont actuellement très étudiés de façon individuelle car l'approche reposant sur les services écosystémiques est plus holistique que les indicateurs biologiques classiques. Les axes de recherche futurs devraient s'intéresser aux liens qui existent entre ces attributs. Les paragraphes subséquents introduisent quelques domaines émergents relatifs à ces liaisons.

#### 7.3.2.1. *Lien entre la diversité structurelle et la diversité fonctionnelle*

Un axe effervescent tente de faire le lien entre l'influence d'un changement de diversité structurelle sur la diversité fonctionnelle (Caldwell, 2005; Bastida et al., 2008; Garbisu et al., 2011; Wallenstein & Hall, 2012; Pereira e Silva et al., 2013). La méthodologie présentée dans cette thèse, combinée à un test évaluant la toxicité d'un contaminant sur la diversité microbienne, serait donc un projet innovateur très opportun.

#### 7.3.2.2. *Lien entre la diversité structurelle et la stabilité fonctionnelle*

Les scientifiques croient aussi qu'un plus grand bassin d'espèces microbiennes assure une plus grande stabilité des fonctions de l'écosystème faisant face à des stress additionnels (section 7.1) (Giller et al., 2009; Mooney et al., 2009; De Lange et al., 2010; Garbisu et al., 2011; Veraart et al., 2011; Shade et al., 2012; Pereira e Silva et al., 2013; Zell & Hubbart, 2013). Il serait ainsi très intéressant de développer une méthodologie utilisant la stabilité fonctionnelle combinée avec une méthode de diversité structurelle pour évaluer la santé globale d'un écosystème.

#### 7.3.2.3. *Étude de l'effet des changements climatiques sur les services écosystémiques*

Les changements climatiques engendreront des impacts directs (ex : fluctuation des températures et des précipitations dans les sols) ou indirectes (ex: impact sur la végétation) sur l'activité enzymatique des sols et sur les attributs de pertinence écologique (Mooney et al., 2009; Allison & Treseder, 2011; Bloor & Bardgett, 2012; Henry, 2012; Wallenstein & Hall, 2012; Burns et al., 2013). Il serait donc très opportun d'étudier ces impacts en utilisant la stabilité et/ou la diversité fonctionnelle enzymatique.

## CONCLUSION

Globalement, la thèse a permis de définir les bases d'une méthodologie d'évaluation de toxicité terrestre *in situ* adaptée à une contamination de Zn à long terme et basée sur la diversité fonctionnelle enzymatique, un attribut de pertinence écologique très promu. Cette méthodologie inclut l'influence de la spéciation du Zn et de la possible tolérance de la communauté microbienne au Zn, deux concepts très importants souvent omis dans les études antérieures. L'application de cette méthodologie à plus grande échelle pourrait conduire à une méthode ou plus spécifiquement un test écotoxicologique terrestre relativement rapide et abordable, facile et sans risque majeur sur la santé du manipulateur puisque les analyses expérimentales requièrent du matériel de laboratoire usuel, les techniciens ne nécessitent que des connaissances de base pour opérer les instruments de mesure, et l'agrégation statistique des résultats enzymatiques est simple.

L'indice de diversité fonctionnelle enzymatique des sols contaminés par le Zn a permis de générer une donnée écotoxique  $EC_{50}$  réaliste. La donnée  $EC_{50}$  produite est d'ailleurs basée sur la concentration biodisponible du métal des sols pour laquelle les unités sont consistantes avec les équations présentées dans la sous-section 1.1.3. De plus, l'activité enzymatique agrégée reste bien corrélée à un gradient de Zn biodisponible et ce même après plusieurs années d'exposition de la communauté microbienne au Zn. Il n'est donc pas nécessaire d'évaluer la stabilité enzymatique dans le présent contexte.

### 7.4. Contribution scientifique

En bref, la thèse a permis:

- De montrer que, même si la concentration de Zn biodisponible varie dans des échantillons de sols contaminés au Zn mis en contact durant 2 h avec différentes solution (eau ou tampons), cela n'influence pas l'activité enzymatique après 2h d'incubation
- De montrer que le pH des échantillons de sols lors d'essais enzymatiques conduits dans l'eau reste stable pendant au moins 2h

- De montrer que les solutions tampons ont intérêt à être remplacées par de l'eau dans les essais enzymatiques sur des sols contaminés par les Zn, surtout lorsque le pH des tampons est très basique
- D'optimiser la méthode de stabilité enzymatique RSSI de sorte à intégrer l'historique physico-chimique des sites d'échantillonnage dans les scores
- De générer trois nouveaux scores de stabilité enzymatiques et d'évaluer leur performance comparativement aux autres scores disponibles
- D'identifier le score de stabilité fonctionnelle le plus sensible au Zn, soit le nouveau score RSSIb qui intègre l'historique physico-chimique des sites d'échantillonnage
- De développer un indice de diversité fonctionnelle enzymatique corrélé à la concentration du Zn biodisponible des sols et statistiquement valide
- De montrer que l'activité enzymatique agrégée des sols contaminés lentement par le Zn et collectés sur le terrain demeure sensible à un gradient de Zn biodisponible, même si de possibles mécanismes de tolérance au Zn ont pris place au sein de la communauté microbienne de ces sols
- De montrer que la stabilité enzymatique agrégée, bien qu'optimisée et aussi corrélée à un gradient de Zn biodisponible des sols, n'apporte pas suffisamment d'information écotoxicologique complémentaire à l'approche par l'activité enzymatique agrégée pour que cela vaille la peine d'investir davantage de temps et de ressource pour son évaluation.

## 7.5. Contribution pratique

Durant ce projet de doctorat, différents outils ont été développés :

- Un score de stabilité enzymatique optimisé qui pourra être testé dans des domaines multi-stress comme l'écotoxicologie, la santé des sols et l'étude de l'impact des changements climatiques
- Une démarche statistique qui permet de valider que la combinaison de plusieurs variables (ici, l'activité individuelle de plusieurs enzymes du sol) en une seule variable (ici, l'indice enzymatique agrégé) est valide

- Un indice de diversité fonctionnelle enzymatique qui pourrait être testé sur d'autres sols contaminés par des métaux ou autres contaminants organiques persistants affectant l'activité enzymatique
- Une méthodologie d'évaluation de la toxicité terrestre du Zn intégratrice couvrant différentes fonctions enzymatiques et adaptée au contexte de contamination métallique qui pourra générer rapidement des données écotoxiques liées à la diversité fonctionnelle enzymatique de la communauté microbienne du sol

Cette méthodologie appliquée à d'autres métaux pourrait générer de nouvelles données écotoxiques  $EC_{50}$  basées principalement sur l'activité microbienne du sol, un niveau trophique peu utilisé en écotoxicologie. Ces données pourraient ensuite être intégrées aux bases de données écotoxiques afin d'être éventuellement utilisées en ÉICV et même en analyse environnementale du risque des contaminants utilisée dans plusieurs entreprises. L'analyse de cycle de vie cherche à réduire l'impact environnemental de nos choix de société, réduisant ultimement les dépenses publiques nécessaires pour restaurer les écosystèmes et soigner les maladies engendrées par la pollution. En solidifiant les modélisations écotoxiques terrestres des métaux, l'ACV devient un outil environnemental de plus en plus robuste, juste et préconisé pouvant être utilisé par les industries et les décideurs afin d'orienter les développements technologiques vers une économie verte et dans la perspective du développement durable.



## BIBLIOGRAPHIE

- Aboussouan L, van de Meent D, Schönnenbeck M, Hauschild M, Delbeke K, Struijs J, Russell AJ, Udo de Haes EA, Atherton J, van Tilborg W, Karman CC, Korenromp R, Sap G, Dubreuil A, Adams WJ, Heijungs R, Jolliet O, De Koning A, Chapman PM, Ligthart T, Verdonck F, van der Loos R & Kuiper J. 2004. *Declaration of Apeldoorn on LCIA of Non-Ferro Metals*. Paper presented at the Apeldoorn Workshop, Apeldoorn, Netherlands. [http://www.leidenuniv.nl/cml/ssp/projects/declaration\\_of\\_apeldoorn.pdf](http://www.leidenuniv.nl/cml/ssp/projects/declaration_of_apeldoorn.pdf)
- Adams WJ & Chapman PM. 2007. *Assessing the hazard of metals and inorganic metal substances in aquatic and terrestrial systems*. Paper presented at the Workshop on Hazard Identification Approach for Metals and Inorganic Metal Substances, Pensacola Beach, FL USA.
- Alef K & Nannipieri P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press Limited, London, p.
- Allen HE. 2002. *Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes and Plants*, SETAC publication, 158 p.
- Allen HE, Yanqing L & Di Toro DM. 2008. Ecotoxicity of Ni in soil. *Mineralogical Magazine* 72: 367-371.
- Allison SD & Treseder KK. 2011. Climate change feedbacks to microbial decomposition in boreal soils. *Fungal Ecology* 4: 362-374.
- An J, Jeong S, Moon HS, Jho EH & Nam K. 2012. Prediction of Cd and Pb toxicity to *Vibrio fischeri* using biotic ligand-based models in soil. *Journal of Hazardous Materials* 203–204: 69-76.
- Anderson J, Hooper M, Zak J & Cox S. 2009. Characterization of the structural and functional diversity of indigenous soil microbial communities in smelter-impacted and nonimpacted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 534-541.

- Antoniadis V, Tsadilas CD & Samaras V. 2010. Trace element availability in a sewage sludge-amended cotton grown Mediterranean soil. *Chemosphere* 80: 1308-1313.
- Antonious GF. 2009. Enzyme activities and heavy metals concentration in soil amended with sewage sludge. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 44: 1019-1024.
- Baker S, Herrchen M, Hund-Rinke K, Klein W, Kördel W, Peijnenburg W & Rensing C. 2003. Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 6-19.
- Banning NC & Murphy DV. 2008. Effect of heat-induced disturbance on microbial biomass and activity in forest soil and the relationship between disturbance effects and microbial community structure. *Applied Soil Ecology* 40: 109-119.
- Bárcenas-Moreno G & Bååth E. 2009. Bacterial and fungal growth in soil heated at different temperatures to simulate a range of fire intensities. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 2517-2526.
- Bastida F, Zsolnay A, Hernández T & García C. 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147: 159-171.
- Bécaert V. 2004. Évaluation de la stabilité fonctionnelle d'un sol dans le contexte d'étude de la santé d'un sol. Ph. D, École Polytechnique de Montréal, Montréal.
- Bécaert V & Deschenes L. 2006. Using soil health to assess ecotoxicological impacts of pollutants on soil microflora. *Environmental Contaminant Toxicology* 188: 127-148.
- Bécaert V, Samson R & Deschenes L. 2006. Effect of 2,4-D contamination on soil functional stability evaluated using the relative soil stability index (RSSI). *Chemosphere* 64: 1713-1721.

- Bérard A, Bouchet T, Sévenier G, Pablo AL & Gros R. 2011. Resilience of soil microbial communities impacted by severe drought and high temperature in the context of Mediterranean heat waves. *European Journal of Soil Biology* 47: 333-342.
- Bloor JMG & Bardgett RD. 2012. Stability of above-ground and below-ground processes to extreme drought in model grassland ecosystems: Interactions with plant species diversity and soil nitrogen availability. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14: 193-204.
- Bonten LTC, Groenenberg JE, Weng L & van Riemsdijk WH. 2008. Use of speciation and complexation models to estimate heavy metal sorption in soils. *Geoderma* 146: 303-310.
- Boreiko CJ. 2010. Overview of Health Risk Assessments for Zinc. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues* 73: 166 - 174.
- Borg SJ & Liu W. 2010. An XAS study of zinc speciation in aqueous acetate solutions at 25–200°C. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 619: 276-279.
- Bradl HB (2005) Individual Behaviour of Selected Heavy Metals. *Heavy Metals in the Environment* (Bradl, H. B. eds.), (Vol. 6). Elsevier Academic Press, p. 139-143.
- Brady NC & Weil RR. 2008. *The Nature and Properties of Soils*, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, p.
- Brandt KK, Frandsen RJN, Holm PE & Nybroe O. Development of pollution-induced community tolerance is linked to structural and functional resilience of a soil bacterial community following a five-year field exposure to copper. *Soil Biology and Biochemistry* In Press, Corrected Proof.
- Bressan M, Mougel C, Dequiedt S, Maron P-A, Lemanceau P & Ranjard L. 2008. Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensities. [Brief Report]. *Environmental Microbiology* 10: 2184-2187.

- Broos K, Mertens J & Smolders E. 2005. Toxicity of heavy metals in soil assessed with various soil microbial and plant growth assays: a comparative study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 634-640.
- Burns RG (Ed.). 1978. *Soil Enzymes*. London: Academic Press inc.
- Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger ME, Wallenstein MD, Weintraub MN & Zoppini A. 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology & Biochemistry* 58: 216-234.
- Caldwell BA. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* 49: 637-644.
- Caldwell BA, Griffiths RP & Sollins P. 1999. Soil enzyme response to vegetation disturbance in two lowland Costa Rican soils. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 1603-1608.
- Campbell PGC (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model in metal speciation and bioavailability. *Aquatic Systems* (Tessier, A. & Turner, D. R. eds.). UIPAC, John Wiley and Sons, New York, p. 45–102.
- Cances B, Ponthieu M, Castrec-Rouelle M, Aubry E & Benedetti MF. 2003. Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma* 113: 341-355.
- Carter MR & Gregorich EG. 2008. *Soil Sampling and Methods of Analysis*, 2nd ed., CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, p.
- Catlett KM, Heil DM, Lindsay WL & Ebinger MH. 2002. Soil Chemical Properties Controlling Zinc Activity in 18 Colorado Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66: 1182-1189.
- CEAEQ. 2006. *Détermination du carbone et du soufre : méthode par combustion et dosage par spectrophotométrie infrarouge*, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, p.

- Chaer G, Fernandes M, Myrold D & Bottomley P. 2009a. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. *Microbial Ecology* 58: 414-424.
- Chaer GM, Myrold DD & Bottomley PJ. 2009b. A soil quality index based on the equilibrium between soil organic matter and biochemical properties of undisturbed coniferous forest soils of the Pacific Northwest. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 822-830.
- Chaperon S & Sauvé S. 2007. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 2329-2338.
- Chaudri A, Allain C, Barbosa-Jefferson V, Nicholson F, Chambers B & McGrath S. 2000. A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. *Plant and Soil* 221: 167-179.
- Chaudri AM, Knight BP, Barbosa-Jefferson VL, Preston S, Paton G, Killham K, Coad N, Nicholson FA, Chambers BJ & McGrath S. 1999. Determination of acute Zn toxicity in pore water from soils previously treated with sewage sludge using bioluminescence assays. *Environmental Science & Technology* 33: 1880-1885.
- Chmura DJ, Anderson PD, Howe GT, Harrington CA, Halofsky JE, Peterson DL, Shaw DC & Brad St.Clair J. 2011. Forest responses to climate change in the northwestern United States: Ecophysiological foundations for adaptive management. *Forest Ecology and Management* 261: 1121-1142.
- Coppolecchia D, Puglisi E, Vasileiadis S, Suciú N, Hamon R, Maria Beone G & Trevisan M. 2011. Relative sensitivity of different soil biological properties to zinc. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 1798-1807.
- Courchesne F, Kruyts N & Legrand P. 2006. Labile zinc concentration and free copper ion activity in the rhizosphere of forest soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 635-642.

- Csuros M & Csuros C. 2002. *Environmental Sampling and Analysis for Metals*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, U.S.A., p.
- Davis MRH, Zhao F-J & McGrath SP. 2004. Pollution-induced community tolerance of soil microbes in response to a zinc gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 2665-2672.
- De Lange HJ, Sala S, Vighi M & Faber JH. 2010. Ecological vulnerability in risk assessment — A review and perspectives. *Science of The Total Environment* 408: 3871-3879.
- Deicke M, Bellenger J-P & Wichard T. 2013. Direct quantification of bacterial molybdenum and iron metallophores with ultra-high-performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1298: 50-60.
- Deng H. 2012. A review of diversity-stability relationship of soil microbial community: What do we not know? *Journal of Environmental Sciences* 24: 1027-1035.
- Deng H, Li X-F, Cheng W-D & Zhu Y-G. 2009. Resistance and resilience of Cu-polluted soil after Cu perturbation, tested by a wide range of soil microbial parameters. *FEMS Microbiology Ecology* 70: 293-304.
- Diamond M. 2009. *The clearwater consensus: The estimation of metals in fresh water*. Paper presented at the The Clearwater Consensus November 2008, Clearwater, Florida.
- Dick RP. 2011. *Methods of Soil Enzymology*, Soil Science Society of America, Madison, 395 p.
- Du P, Xue N, Liu L & Li F. 2008. Distribution of Cd, Pb, Zn and Cu and their chemical speciations in soils from a peri-smelter area in northeast China. *Environmental Geology* 55: 205-213.
- Dussault M. 2006. Validation d'un indice de la stabilité relative des sols pas l'évaluation de l'activité enzymatique dans le contexte d'une contamination au cuivre. Master Dissertation with article, École Polytechnique de Montréal, Montréal.

- Dussault M, Bécaert V, François M, Sauvé S & Deschênes L. 2008. Effect of copper on soil functional stability measured by relative soil stability index (RSSI) based on two enzyme activities. *Chemosphere* 72: 755-762.
- Eivazi F & Tabatabai MA. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 9: 167-172.
- Epelde L, Becerril JM, Hernández-Allica J, Oihana B & Garbisu C. 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology* 39: 299-310.
- Epelde L, Martín-Sánchez I, González-Oreja JA, Anza M, Gómez-Sagasti MT & Garbisu C. 2012. Impact of sources of environmental degradation on microbial community dynamics in non-polluted and metal-polluted soils. *Science of The Total Environment* 433: 264-272.
- Estevez B. 2006. L'importance des éléments mineurs: des carences à la toxicité - Une préoccupation en agriculture biologique? Québec: Syndicat des producteurs de grains biologiques du Québec (SPGBQ).
- Gaabass I, Murimboh JD & Hassan NM. 2009. A study of diffusive gradients in thin films for the chemical speciation of Zn(II), Cd(II), Pb(II), and Cu(II): The role of kinetics. *Water, Air, and Soil Pollution* 202: 131-140.
- Gandhi N, Diamond M, De Meent DV, Huijbregts M, Peijnenburg WJGM & Guinée J. 2010. New method for calculating comparative toxicity potential of cationic metals in freshwater: Application to copper, nickel and zinc. *Environmental Science & Technology* In press.
- Gao Y, Zhou P, Mao L, Zhi Y-e & Shi W-j. 2010. Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure: Modified ecological dose-response model and PCR-RAPD. *Environmental Earth Sciences* 60: 603-612.
- Garbisu C, Alkorta I & Epelde L. 2011. Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance. *Applied Soil Ecology* 49: 1-4.

- García-Ruiz R, Ochoa V, Hinojosa MB & Carreira JA. 2008. Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2137-2145.
- Garnier E, Cortez J, Billès G, Navas M-L, Roumet C, Debussche M, Laurent G, Blanchard A, Aubry D, Bellmann A, Neill C & Toussaint J-P. 2004. Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology* 85: 2630-2637.
- German DP, Weintraub MN, Grandy AS, Lauber CL, Rinkes ZL & Allison SD. 2011. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 1387-1397.
- Giller KE, Witter E & McGrath SP. 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 2031-2037.
- Gloria TP, Russell AJ, Atherton J, Baker SR & Cook M. 2006. Ecological toxicity methods and metals: an examination of two case studies. *International Journal of LCA* 11: 26-33.
- Goedkoop M & Spriensma R. 1999. Eco-indicator 99, methodology report and appendix. Netherlands: Pré Consultants.
- Green JW, Springer TA & Staveley JP. 2013. The drive to ban the NOEC/LOEC in favor of ECx is misguided and misinformed. *Integrated Environmental Assessment and Management* 9: 12-16.
- Gregory AS, Watts CW, Griffiths BS, Hallett PD, Kuan HL & Whitmore AP. 2009. The effect of long-term soil management on the physical and biological resilience of a range of arable and grassland soils in England. *Geoderma* 153: 172-185.
- Griffiths B, Hallett P, Kuan H, Gregory A, Watts C & Whitmore A. 2008. Functional resilience of soil microbial communities depends on both soil structure and microbial community composition. *Biology and Fertility of Soils* 44: 745-754.



- Griffiths BS, Bonkowski M, Roy J & Ritz K. 2001. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology* 16: 49-61.
- Griffiths BS, Hallett PD, Kuan HL, Pitkin Y & Aitken MN. 2005. Biological and physical resilience of soil amended with heavy metal-contaminated sewage sludge. *European Journal of Soil Science* 56: 197-206.
- Griffiths BS & Philippot L. 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 112-129.
- Griffiths BS, Ritz K, Bardgett RD, Cook R, Christensen S, Ekelund F, Sørensen SJ, Bååth E, Bloem J, De Ruiter PC, Dolfing J & Nicolardot B. 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos* 90: 279-294.
- Guénon R & Gros R. 2012. Frequent-wildfires with shortened time-since-fire affect soil microbial functional stability to drying and rewetting events. *Soil Biology & Biochemistry*.
- Guinée JB, Gorré M, Heijungs R, Huppes G, Kleijn R, De Koning A, Van Oers L, Wegener Sleeswijk A, Suh S, Udo de Haes HA, De Bruijn JA, Van Duin R & Huijbregts MAJ. 2002. Handbook on Life Cycle Assessment: Operational Guide to the ISO Standards. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Haanstra L & Doelman P. 1991. An ecological dose-response model approach to short- and long-term effects of heavy metals on arylsulphatase activity in soil. *Biology and Fertility of Soils* 11: 18-23.
- Haanstra L, Doelman P & Voshaar JHO. 1985. The use of sigmoidal dose response curves in soil ecotoxicological research. *Plant and Soil* 84: 293-297.

- Hantke K. 2005. Bacterial zinc uptake and regulators. *Current Opinion in Microbiology* 8: 196-202.
- Hauschild M, Huijbregts M, Jolliet O, Macleod M, Margni M, De Meent DV, Rosenbaum R & McKone TE. 2008. Building a model based on scientific consensus for life cycle impact assessment of chemicals: the search for harmony and parcimony. *Environmental Science & Technology* 42: 7032-7037.
- Hauschild M & Pennington DW (2002) Indicators for Ecotoxicity in Life-Cycle Impact Assessment. *Life-Cycle Impact Assessment: Striving toward Best Practice* (Udo de Haes, E. A., Finnveden, G., Goedkoop, M., Hauschild, M., Hertwich, E. G., Hofstetter, P., Jolliet, O., Klöpffer, P., Krewitt, W., Lindeijer, E., Müller-Wenk, R., Olsen, S. I., Pennington, D. W., Potting, J. & Steen, B. eds.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, p. 149-176.
- Hauschild MZ. 2005. Assessing Environmental Impacts in a Life-Cycle Perspective. *Environmental Science & Technology* 39: 81A-88A.
- Haye S, Slaveykova V & Payet J. 2007. Terrestrial ecotoxicity and effect factors of metals in life cycle assessment (LCA). *Chemosphere* 68: 1489-1496.
- Heijungs R, de Koning A, Ligthart T & Korenromp R. 2004. Improvement of LCA characterization factors and LCA practice for metals. In TNO Environment, E. a. P. I. (Ed.), (pp. 71). Apeldoorn.
- Henry HAL. 2012. Soil extracellular enzyme dynamics in a changing climate. *Soil Biology & Biochemistry* 47: 53-59.
- Hinojosa MB, Carreira JA, García-Ruíz R & Dick RP. 2004a. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1559-1568.

- Hinojosa MB, Carreira JA, Rodriguez-Maroto JM & García-Ruiz R. 2008. Effects of pyrite sludge pollution on soil enzyme activities: Ecological dose–response model. *Science of the Total Environment* 396: 89-99.
- Hinojosa MB, García-Ruiz R, Viñegla B & Carreira JA. 2004b. Microbiological rates and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcollar toxic spill. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1637-1644.
- Huang Y, Martin LM, Isbell FI & Wilsey BJ. 2013. Is community persistence related to diversity? A test with prairie species in a long-term experiment. *Basic and Applied Ecology* 14: 199-207.
- Isnard P, Flammarion P, Roman G, Babut M, Bastien P, Bintein S, Esserméant L, Féraud JF, Gallotti-Schmitt S, Saouter E, Saroli M, Thiébaud H, Tomassone R & Vindimian E. 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere* 45: 659-669.
- IZA. 2011. International Zinc Association Website. <http://www.zinc.org/>
- Janssen CR, Heijerick DG, De Schamphelaere KAC & Allen HE. 2003. Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. *Environment International* 28: 793-800.
- Jolliet O, Margni M, Charles R, Payet J, Rebitzer G & Rosenbaum R. 2003. IMPACT 2002+: A new life cycle impact assessment methodology. *International Journal of LCA* 8: 324-330.
- Jolliet O, Müller-Wenk R, Bare J, Brent A, Goedkoop M, Heijungs R, Itsubo N, Pena C, Pennington DW, Potting J, Rebitzer G, Stewart M, Udo de Haes EA & Weidoma B. 2004. The LCIA midpoint-damage framework of the UNEP/SETAC Life Cycle Initiative. *International Journal of LCA* 9: 394-404.
- Jolliet O, Rosenbaum R, Chapman PM, McKone TE, Margni M, Scheringer M, van Straalen N & Wania F. 2006. Establishing a framework for life cycle toxicity assessment. *International Journal of LCA* 11: 209-212.

- Jolliet O, Saadé M & Crettaz P. 2005. *Analyse du cycle de vie: Comprendre et réaliser un écobilan*, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 242 p.
- Kandeler E & Gerber H. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 6: 68-72.
- Kandeler E, Kampichler C & Horak O. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 23: 299-306.
- Kefford BJ, Zalizniak L, Warne MSJ & Nugegoda D. 2008. Is the integration of hormesis and essentiality into ecotoxicology now opening Pandora's Box? *Environmental Pollution* 151: 516-523.
- Killham K & J. SW (2002) Bioindicators and Sensors of Soil Health and the Application of Geostatistics. *Enzymes in the Environment* (Burns, R. G. & Dick, R. P. eds.). Marcel ceker inc., New York, p. 391-405.
- Kim B, McBride MB & Hay AG. 2008. Urease activity in aged copper and zinc-spiked soils: relationship to CaCl<sub>2</sub>-extractable metals and Cu<sup>2+</sup> activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 2469-2475.
- Knight BP, Chaudri AM, McGrath SP & Giller KE. 1998. Determination of chemical availability of cadmium and zinc in soils using inert soil moisture samplers. *Environmental Pollution* 99: 293-298.
- Knight TR & Dick RP. 2004. Differentiating microbial and stabilized b-glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 2089-2096.
- Kookana RS, Correl R & Barnes M. 2006. Ecological Risk Assessment for Terrestrial Ecosystems: The Summary of Discussion and Recommendations from the Adelaide Workshop (April 2004). *Human and Ecological Risk Assessment* 12: 130-138.

- Kool PL, Ortiz MD & van Gestel CAM. 2011. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl<sub>2</sub> to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution* 159: 2713-2719.
- Kools SAE, Berg MP, Boivin M-EY, Kuenen FJA, van der Wurff AWG, van Gestel CAM & van Straalen NM. 2008. Stress responses investigated; application of zinc and heat to Terrestrial Model Ecosystems from heavy metal polluted grassland. *Science of The Total Environment* 406: 462-468.
- Kuan HL, Hallett PD, Griffiths BS, Gregory AS, Watts CW & Whitmore AP. 2007. The biological and physical stability and resilience of a selection of Scottish soils to stresses. *European Journal of Soil Science* 58: 811-821.
- Kwon-Rae K & Owens G. 2009. Chemodynamics of heavy metals in long-term contaminated soils: Metal speciation in soil solution. *Journal of Environmental Sciences* 21: 1532-1540.
- Lamb DT, Ming H, Megharaj M & Naidu R. 2009. Heavy metal (Cu, Zn, Cd and Pb) partitioning and bioaccessibility in uncontaminated and long-term contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 171: 1150-1158.
- Larsen HF & Hauschild M. 2007. Evaluation of ecotoxicity effect indicators for use in LCIA. *International Journal of LCA* 12: 24-33.
- Lee S-H, Kim E-Y, Hyun S & Kim J-G. 2009. Metal availability in heavy metal-contaminated open burning and open detonation soil: Assessment using soil enzymes, earthworms, and chemical extractions. *Journal of Hazardous Materials* 170: 382-388.
- Lessard I, Renella G, Sauvé S & Deschênes L. 2013a. Metal toxicity assessment in soils using enzymatic activity: Can water be used as a surrogate buffer? *Soil Biology & Biochemistry* 57: 256-263.
- Lessard I, Sauvé S & Deschênes L. 2013b. Linking Zn co-tolerance to soil enzymes resilience by a RSSI-based functional stability score. *FEMS Microbiology Ecology*.

- Li Y-T, Rouland C, Benedetti M, Li F-b, Pando A, Lavelle P & Dai J. 2009. Microbial biomass, enzyme and mineralization activity in relation to soil organic C, N and P turnover influenced by acid metal stress. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 969-977.
- Liiri M, Häsä M, Haimi J & Setälä H. 2012. History of land-use intensity can modify the relationship between functional complexity of the soil fauna and soil ecosystem services – A microcosm study. *Applied Soil Ecology* 55: 53-61.
- Liu M, Chen X, Chen S, Li H & Hu F. 2011. Resource, biological community and soil functional stability dynamics at the soil–litter interface. *Acta Ecologica Sinica* 31: 347-352.
- Liu M, Chen X, Griffiths BS, Huang Q, Li H & Hu F. 2012. Dynamics of nematode assemblages and soil function in adjacent restored and degraded soils following disturbance. *European Journal of Soil Biology* 49: 37-46.
- Lock K & Janssen CR. 2003. Influence of ageing on zinc bioavailability in soils. *Environmental Pollution* 126: 371-374.
- Lock K & Janssen CR. 2005. Influence of soil zinc concentrations on zinc sensitivity and functional diversity of microbial communities. *Environmental Pollution* 136: 275-281.
- López DR, Brizuela MA, Willems P, Aguiar MR, Siffredi G & Bran D. 2013. Linking ecosystem resistance, resilience, and stability in steppes of North Patagonia. *Ecological Indicators* 24: 1-11.
- Lowe CN & Butt KR. 2007. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. *European Journal of Soil Biology* 43: S281-S288.
- MacDonald RS. 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *The Journal of Nutrition* 130: 1500S-1508S.
- Malcolm RE. 1983. Assessment of phosphatase activity in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 15: 403-408.

- Margesin DR & Schinner F. 2005. *Manual of Soil Analysis*, Springer, 366 p.
- Margesin R & Schinner F. 1994. Phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phosphotriesterase, and inorganic pyrophosphatase activities in forest soils in an alpine area: effect of pH on enzyme activity and extractability. *Biology and Fertility of Soils* 18: 320-326.
- Marinari S, Bonifacio E, Moscatelli MC, Falsone G, Antisari LV & Vianello G. 2013. Soil development and microbial functional diversity: Proposal for a methodological approach. *Geoderma* 192: 437-445.
- Marinari S, Carbone S, Vittori Antisari L, Grego S & Vianello G. 2012. Microbial activity and functional diversity in Psamment soils in a forested coastal dune-swale system. *Geoderma* 173-174: 249-257.
- Martin TD, Creed JT & Brockhoff CA. 1994. *Method 200.2: Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements*, Environmental Protection Agency (EPA), Cincinnati, 12 p.
- Marx MC, Kandeler E, Wood M, Wermbter N & Jarvis SC. 2005. Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 35-48.
- McCall KA & Fierke CA. 1998. *Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes*. Paper presented at the Zinc and Health: Current Status and Future Directions, Bethesda, MD.
- McCann KS. 2000. The diversity-stability debate. [10.1038/35012234]. *Nature* 405: 228-233.
- MDDEP (1998, November 2001). *Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés*. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEP). Retrieved May 12, 2013, From [http://www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe\\_2\\_tableau\\_1.htm](http://www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe_2_tableau_1.htm)
- Medina MH, Correa JA & Barata C. 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67: 2105-2114.

- Mench M, Renella G, Gelsomino A, Landi L & Nannipieri P. 2006. Biochemical parameters and bacterial species richness in soils contaminated by sludge-borne metals and remediated with inorganic soil amendments. *Environmental Pollution* 144: 24-31.
- Mertens J, Degryse F, Springael D & Smolders E. 2007a. Zinc Toxicity to Nitrification in Soil and Soilless Culture Can Be Predicted with the Same Biotic Ligand Model. *Environmental Science & Technology* 41: 2992-2997.
- Mertens J, Ruyters S, Springael D & Smolders E. 2007b. Resistance and resilience of zinc tolerant nitrifying communities is unaffected in long-term zinc contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1828-1831.
- Mertens J, Wakelin SA, Broos K, McLaughlin MJ & Smolders E. 2010. Extent of copper tolerance and consequences for functional stability of the ammonia-oxidizing community in long-term copper-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29: 27-37.
- Meylan S, Odzak N, Behra R & Sigg L. 2004. Speciation of copper and zinc in natural freshwater: comparison of voltammetric measurements, diffusive gradients in thin films (DGT) and chemical equilibrium models. *Analytica Chimica Acta* 510: 91-100.
- Mobley HLT & Hausinger RP. 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews* 53: 85-108.
- Mooney H, Larigauderie A, Cesario M, Elmquist T, Hoegh-Guldberg O, Lavorel S, Mace GM, Palmer M, Scholes R & Yahara T. 2009. Biodiversity, climate change, and ecosystem services. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 1: 46-54.
- Moreno JL, Bastida F, Ros M, Hernández T & García C. 2009. Soil organic carbon buffers heavy metal contamination on semiarid soils: Effects of different metal threshold levels on soil microbial activity. *European Journal of Soil Biology* 45: 220-228.



- Moreno JL, García C, Landi L, Falchini L, Pietramellara G & Nannipieri P. 2001. The ecological dose value (ED50) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 483-489.
- Müller AK, Westergaard K, Christensen S & Sørensen SJ. 2002. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology* 44: 49-58.
- Nannipieri P, Kandeler E & Ruggiero P (2002) Chapter 1: Enzyme Activities and Microbiological and Biochemical Processes in Soils. *Enzymes in the Environment - Activity, Ecology and Applications* (Burns, R. G. & Dick, R. P. eds.). Marcel Dekker Inc, New York, NY, USA, p. 1-33.
- NC-IUBMB (1992, May 2013). *Enzyme Nomenclature*. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). From <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- Niinemets Ü. 2010. Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management* 260: 1623-1639.
- Nolan AL, Zhang H & McLaughlin MJ. 2005. Prediction of zinc, cadmium, lead, and copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffusive gradients in thin films, extraction, and isotopic dilution techniques. *Journal of Environmental Quality* 34: 496-507.
- Orwin KH & Wardle DA. 2004. New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1907-1912.
- Owsianiak M, Rosenbaum RK, Huijbregts MAJ & Hauschild MZ. 2013. Addressing Geographic Variability in the Comparative Toxicity Potential of Copper and Nickel in Soils. *Environmental Science & Technology* 47: 3241-3250.

- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL, Galvez F, Gensemer RW, Goss GG, Hogstrand C, Janssen CR, McGeer JC, Naddy RB, Playle RC, Santore RC, Schneider U, Stubblefield WA, Wood CM & Wu KB. 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133: 3-35.
- Patnaik P. 2003. Handbook of Inorganic Chemicals (pp. 980-983): McGraw-Hill.
- Paul EA (Ed.). 2007. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Burlington: Academic Press, Elsevier.
- Payet J. 2004. Assessing toxic impacts on aquatic ecosystems in life cycle assessment (LCA). Thesis (Ph.D.), École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne.
- Pereira e Silva MC, Semenov AV, Schmitt H, Dirk van Elsas J & Salles JF. 2013. Microbe-mediated processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning. *Soil Biology & Biochemistry* 57: 995-1002.
- Pettersen J & Hertwich EG. 2008. Critical Review: Life cycle inventory procedures for long-term release of metals. *Environmental Science & Technology* 42: 4639-4647.
- Philippot L, Cregut M, Chèneby D, Bressan M, Dequiet S, Martin-Laurent F, Ranjard L & Lemanceau P. 2008. Effect of primary mild stresses on resilience and resistance of the nitrate reducer community to a subsequent severe stress. *FEMS Microbiology Letters* 285: 51-57.
- Pignataro A, Moscatelli MC, Mocali S, Grego S & Benedetti A. 2012. Assessment of soil microbial functional diversity in a coppiced forest system. *Applied Soil Ecology* 62: 115-123.
- Pizzol M, Christensen P, Schmidt J & Thomsen M. Eco-toxicological impact of "metals" on the aquatic and terrestrial ecosystem: A comparison between eight different methodologies for Life Cycle Impact Assessment (LCIA). *Journal of Cleaner Production* 19: 687-698.

- Plaza GA, Nalecz-Jawecki G, Pinyakong O, Illmer P & Margesin R. 2010. Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy-metal- and hydrocarbon-contaminated sites. *Environmental Monitoring Assessment* 163: 477-488.
- Posthuma L & Notenboom J. (1996). Toxic effects of heavy metals in three worm species exposed in artificially contaminated soil substrates and contaminated field soils. National Institute of Public Health and the Environment, Netherlands 79 p.
- Posthuma L, Suter II GW & Traas TP (Eds.). 2002. *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Boca raton: Lewis Publishers, CRC Press LLC.
- Puglisi E, Del Re AAM, Rao MA & Gianfreda L. 2006. Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 1673-1681.
- Qin Y & Cabral JMS. 2002. Properties and applications of urease - Review. *Biocatalysis and Biotransformation* 20: 1-14.
- Quiquampoix H, Servagent-Noinville S & Baron M-H (2002) Chapter 11: Enzymes Adsorption on Soil Mineral Surfaces and Consequences for the Catalytic Activity. *Enzymes in the Environment - Activity, Ecology and Applications* (Burns, R. G. & Dick, R. P. eds.). marcel Dekker Inc., New York, p. 285-306.
- Rajendhran J & Gunasekaran P. 2011. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research* 166: 99-110.
- Reichman SM. 2002. *The responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on copper, Manganese and Zinc*, The Australian Minerals & Energy Environment Foundation, Melbourne, 54 p.
- Reimann C & Garrett RG. 2005. Geochemical background--concept and reality. *Science of the Total Environment* 350: 12-27.

- Renella G, Landi L, Ascher J, Ceccherini MT, Pietramellara G & Nannipieri P. 2006. Phosphomonoesterase production and persistence and composition of bacterial communities during plant material decomposition in soils with different pH values. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 795-802.
- Renella G, Mench M, Gelsomino A, Landi L & Nannipieri P. 2005a. Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1498-1506.
- Renella G, Mench M, Landi L & Nannipieri P. 2005b. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 133-139.
- Renella G, Mench M, Van Der Lelie D, Pietramellara G, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L & Nannipieri P. 2004. Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 443-451.
- Renella G, Ortigoza ALR, Landi L & Nannipieri P. 2003. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED50). *Soil Biology & Biochemistry* 35: 1203-1210.
- Ritz K, Black HJJ, Campbell CD, Harris JA & Wood C. 2009. Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecological Indicators* 9: 1212-1221.
- Rodríguez-Loinaz G, Onaindia M, Amezaga I, Mijangos I & Garbisu C. 2008. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 49-60.
- Römbke J & Knacker T. 2003. Standardisation of terrestrial ecotoxicological effect methods: An example of successful international co-operation. *Journal of Soils and Sediments* 3: 237-238.

- Rooney N & McCann KS. 2012. Integrating food web diversity, structure and stability. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 40-46.
- Rosenbaum R, Bachmann TM, Gold LS, Huijbregts M, Jolliet O, Juraske R, Koehler A, Larsen HF, Macleod M, Margni M, McKone TE, Payet J, Schuhmacher M, van de Meent D & Hauschild M. 2008. USEtox- the UNEP-SETAC toxicity model: recommended characterisation factors for human toxicity and freshwater ecotoxicity in life cycle impact assessment. *International Journal of LCA* 13: 532-546.
- Ross D. 1987. Assays of invertase activity in acidic soils: Influence of buffers. *Plant and Soil* 97: 285-289.
- Rusk JA, Hamon RE, Stevens DP & McLaughlin MJ. 2004. Adaptation of soil biological nitrification to heavy metals. *Environmental Science & Technology* 38: 3092-3097.
- Rutgers M & Breure AM. 1999. Risk assessment, microbial communities and pollution-induced community tolerance. *Human and Ecological Risk Assessment* 5: 661-670.
- Rutgers M, Schouten AJ, Bloem J, Van Eekeren N, De Goede RGM, Jagersop Akkerhuis GAJM, Van der Wal A, Mulder C, Brussaard L & Breure AM. 2009. Biological measurements in a nationwide soil monitoring network. *European Journal of Soil Science* 60: 820-832.
- Rutgers M, van Wijnen HJ, Schouten AJ, Mulder C, Kuiten AMP, Brussaard L & Breure AM. 2012. A method to assess ecosystem services developed from soil attributes with stakeholders and data of four arable farms. *Science of The Total Environment* 415: 39-48.
- Ruyters S, Mertens J, Springael D & Smolders E. 2010. Stimulated activity of the soil nitrifying community accelerates community adaptation to Zn stress. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 766-772.
- Ruyters S, Mertens J, Springael D & Smolders E. 2012. Co-tolerance to zinc and copper of the soil nitrifying community and its relationship with the community structure. *Soil Biology & Biochemistry* 44: 75-80.

- Sauvé S (2001) Chapter 2: Speciation of metals in soils. *Bioavailability of Metals on Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants* (Allen, H. E. eds.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), p. 7-38.
- Sauvé S (2003) The Role of Chemical Speciation in Bioavailability. *Bioavailability, Toxicity, and Risk Relationships in Ecosystems* (R., N., Gupta, V. V. S. R., Rogers, S., Kookana, R. S., Bolan, N. S. & Adriano, D. C. eds.). Science Publishers, Inc., Enfield, p. 59-82.
- Sauvé S, Hendershot W & Allen HE. 2000. Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology* 34: 1125-1131.
- Sauvé S & Parker DR (2005) Chapter 14: Chemical Speciation of Trace Elements in Soil Solution. *Chemical Processes in Soils* (America, S. S. S. o. eds.), (Vol. 8), Madison, p. 655-688.
- Scherrer B. 2009. *Biostatistique, volume 2*, Gaëtan Morin Chenelière Éducation Inc., Montréal, QC, Canada, 576 p.
- Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E & Margesin DR. 1996. *Methods in Soil Biology*, Springer, Heidelberg, 426 p.
- Shade A, Peter H, Allison SD, Baho D, Berga M, Buergermann H, Huber DH, Langenheder S, Lennon JT, Martiny JB, Matulich KL, Schmidt TM & Handelsman J. 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology* 3: 417 (411-419).
- Shu WS, Ye ZH, Lan CY, Zhang ZQ & Wong MH. 2002. Lead, zinc and copper accumulation and tolerance in populations of *Paspalum distichum* and *Cynodon dactylon*. *Environmental Pollution* 120: 445-453.

- Sinsabaugh RL, Reynolds H & Long TM. 2000. Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 2095-2097.
- Smolders E, Buekers J, Oliver I & McLaughlin MJ. 2004. Soil properties affecting toxicity of zinc to soil microbial properties in laboratory-spiked and field-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 2633-2640.
- Smolders E, McGrath S, Lombi E, Karman CC, Bernhard R, Cools D, Van den Brande K, Van Os B & Walrave N. 2003. Comparison of toxicity of zinc for soil microbial processes between laboratory-contaminated and polluted field soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2592-2598.
- Smolders E, Oorts K, Van Sprang P, Schoeters I, Janssen CR, McGrath SP & McLaughlin MJ. 2009. Toxicity of trace metals in soil as affected by soil type and aging after contamination: Using calibrated bioavailability models to set ecological soil standards. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1633-1642.
- Speir TW, Kettles HA, Parshotam A, Searle PL & Vlaar LNC. 1995. A simple kinetic approach to derive the ecological dose value, ED50, for the assessment of Cr(VI) toxicity to soil biological properties. *Soil Biology & Biochemistry* 27: 801-810.
- Speir TW & Ross DJ (2002) Hydrolytic Enzyme Activities to Assess Soil Degradation and Recovery. *Enzymes in the Environment* (Burns, R. G. & Dick, R. P. eds.). Marcel Dekker inc., New York, p. 407-431.
- Speir TW, van Schaika AP, Hunterb LC, Ryburnb JL & Percival HJ. 2007a. Attempts to derive EC50 values for heavy metals from land-applied Cu-, Ni-, and Zn-spiked sewage sludge. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 539-549.
- Speir TW, van Shaik AP, Hunter LC, Ryburn JL & Percival HJ. 2007b. Attempts to derive EC50 values for heavy metals from land-applied Cu-, Ni-, and Zn-spiked sewage sludge. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 539-549.

- Stephan CH, Courchesne F, Hendershot WH, McGrath SP, Chaudri AM, Sappin-Didier V & Sauvé S. 2008. Speciation of zinc in contaminated soils. *Environmental Pollution* 155: 208-216.
- Stockdale EA, Banning NC & Murphy DV. 2012. Rhizosphere effects on functional stability of microbial communities in conventional and organic soils following elevated temperature treatment. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Sylvia DM, Hartel PG, Fuhrmann J & A. ZD (Eds.). 2005. *Principles and Applications of Soil Microbiology* (640 ed.). Upper Saddle river: Pearson Prentice Hall.
- Tabatabai A (1994) Soil enzymes. *Methods in Soils Analysis Part 2: Microbiological and Biochemical Properties* (Weaver, R. W., Angle, J. S. & Bottomley, P. S. eds.). Soil Science Society of America, inc., Madison, p. 775-833.
- Tabatabai A & Dick RP (2002) Enzymes in soils. *Enzymes in the Environment* (Burns, R. G. & Dick, R. P. eds.). Marcel Dekker, New York, p. 567-596.
- Tambasco G, Sauvé S, Cook N, McBride M & Hendershot W. 2000. Phytoavailability of Cu and Zn to lettuce (*Lactuca sativa*) in contaminated urban soils. *Canadian Journal of Soil Science* 80: 309-317.
- Tandy S, Barbosa V, Tye A, Preston S, Paton G, Zhang H & McGrath S. 2005. Comparison of different microbial bioassays to assess metal-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 530-536.
- Taylor JP, Wilson B, Mills MS & Burns RG. 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 387-401.
- Templeton DM, Ariese F, Cornelis R, Danielsson L-G, Herbert M, Van Leeuwen HP & Obinski R. 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of



elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches: (IUPAC recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* 72: 1453-1470.

Tobor-Kaplon M, Bloem J, Römken PFAM & de Ruiter PC. 2006a. Functional stability of microbial communities from long-term stressed soils to additional disturbance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 1993-1999.

Tobor-Kaplon M, Bloem J, Römken PFAM & de Ruiter PC. 2006b. Functional stability of microbial communities in contaminated soils near a zinc smelter (Budel, The Netherlands). *Ecotoxicology* 15: 187-197.

Torri SI & Lavado R. 2008. Zinc distribution in soils amended with different kinds of sewage sludge. *Journal of Environmental Management* 88: 1571-1579.

Trasar-Cepeda MC & Gil-Sotres F. 1988. Kinetics of acid phosphatase activity in various soils of Galicia (NW Spain). *Soil Biology & Biochemistry* 20: 275-280.

Tscherko D, Rustemeier J, Richter A, Wanek W & Kandeler E. 2003. Functional diversity of the soil microflora in primary succession across two glacier forelands in the Central Alps. *European Journal of Soil Science* 54: 685-696.

Turner BL. 2010. Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6485-6493.

Underwood AJ. 1997. *Experiments in ecology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 504 p.

van de Meent D & Huijbregts M. 2005. Calculating life-cycle assessment effect factors from potentially affected fraction-based ecotoxicological response functions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1573-1578.

van Elsas JD, Jansson JK & Trevors JT. 2007. *Modern Soil Microbiology*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 646 p.

- Vangheluwe M, Van Sprang P, Verdonck F, Heijerick D, Versonnen B, Vandenbroele M & Van Hyfte A. 2007. *MERAG: Metals Environmental Risk Assessment Guidance*, The International Council on Mining and Metals, London, UK, 84 p.
- Veleva L, Meraz E & Acosta M. 2007. *Zinc corrosion runoff process induced by humid tropical climate*, Vol. 58, Wiley-VCH, Weinheim, 5 p.
- Veleva L, Meraz E & Acosta M. 2010. Zinc precipitation runoff from galvanised steel in humid tropical climate. *Corrosion Engineering Science and Technology* 45: 76-83.
- Veraart AJ, Faassen EJ, Dakos V, van Nes EH, Lürling M & Scheffer M. 2011. Recovery rates reflect distance to a tipping point in a living system. *Nature* 481: 357-359.
- Vinebrooke RD, Cottingham KL, Norberg J, Scheffer M, Dodson SI, Maberly SC & Sommer U. 2004. Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos* 104: 451-457.
- Walker CH, Hopkins SP, Sibly RM & Peakall DB. 2006. *Principles of ecotoxicology*, 3rd ed., Taylor and Francis Group, Boca Raton, 315 p.
- Wallenstein M & Hall E. 2012. A trait-based framework for predicting when and where microbial adaptation to climate change will affect ecosystem functioning. *Biogeochemistry* 109: 35-47.
- Wallenstein MD & Weintraub MN. 2008. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2098-2106.
- Wang X, Hua L & Ma Y. 2012. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for barley (*Hordeum vulgare*): Influence of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH. *Chemosphere* 89: 89-95.
- Weed DL. 2005. Weight of Evidence: A Review of Concept and Methods. *Risk Analysis* 25: 1545-1557.

- Wegener Sleeswijk A & Heijungs R. 2010. GLOBOX: A spatially differentiated global fate, intake and effect model for toxicity assessment in LCA. *Science of the Total Environment* 408: 2817-2832.
- Weimer M, Jiang X, Ponta O, Stanzel S, Freyberger A & Kopp-Schneider A. 2012. The impact of data transformations on concentration–response modeling. *Toxicology Letters* 213: 292-298.
- Weng L, Temminghoff EJM, Lofts S, Tipping E & Van Riemsdijk WH. 2002. Complexation with Dissolved Organic Matter and Solubility Control of Heavy Metals in a Sandy Soil. *Environmental Science & Technology* 36: 4804-4810.
- Wittebolle L, Marzorati M, Clement L, Balloi A, Daffonchio D, Heylen K, De Vos P, Verstraete W & Boon N. 2009. Initial community evenness favours functionality under selective stress. [10.1038/nature07840]. *Nature* 458: 623-626.
- Yachi S & Loreau M. 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 1463-1468.
- Yavitt JB, Wright J & Wieder K. 2004. Seasonal drought and dry-season irrigation influence leaf-litter nutrients and soil enzymes in a moist, lowland forest in Panama. *Australian Ecology* 29: 177-188.
- Zagury GJ. 1997. Étude d'un traitement par bioloxydation au moyen de la microflore indigène ferroxydante des sols contaminées aux métaux lourds (Zn, Cu, Mn). Thesis, Université de Sherbrooke, Sherbrooke.
- Zell C & Hubbart JA. 2013. Interdisciplinary linkages of biophysical processes and resilience theory: Pursuing predictability. *Ecological Modelling* 248: 1-10.
- Zhang B, Deng H, Wang H-l, Yin R, Hallett PD, Griffiths BS & Daniell TJ. 2010. Does microbial habitat or community structure drive the functional stability of microbes to

stresses following re-vegetation of a severely degraded soil? *Soil Biology & Biochemistry* 42: 850-859.

Zhang B, Wang H, Yao S & Bi L. 2013. Litter quantity confers soil functional resilience through mediating soil biophysical habitat and microbial community structure on an eroded bare land restored with mono *Pinus massoniana*. *Soil Biology & Biochemistry* 57: 556-567.

Zhang H, Lombi E, Smolders E & McGrath S. 2004. Kinetics of Zn release in soils and prediction of Zn concentration in plants using diffusive gradients in thin films. *Environmental Science & Technology* 38: 3608-3613.

Zhang XG. 1996. *Corrosion and Electrochemistry of Zinc*, Plenum Press, New York, 474 p.

Zhang ZQ, Wong MH, Nie XP & Lan CY. 1998. Effects of zinc (zinc sulfate) on Rhizobia-earleaf acacia (*Acacia auriculaeformis*) symbiotic association. *Bioresource Technology* 64: 97-104.

Zhao B, Chen J, Zhang J & Qin S. 2010. Soil microbial biomass and activity response to repeated drying–rewetting cycles along a soil fertility gradient modified by long-term fertilization management practices. *Geoderma* 160: 218-224.

Zhou Y, Yao J, Choi MMF, Chen Y, Chen H, Mohammad R, Zhuang R, Chen H, Wang F, Maskow T & Zaray G. 2009. A combination method to study microbial communities and activities in zinc contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 169: 875-881.

## ANNEXES

Annexe 1: Échantillonnage de sols près de structures faites d'acier galvanisé dans le cadre du projet de contamination de sols au zinc pour des fins d'analyses physico-chimiques et écotoxiques.

 <b>CIRAIG</b> Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
			
Protocole # :PE70-A		Nombre de pages : 20	
Version :3		Date : 2 octobre 2007	
Auteur(s): Isabelle Lessard _____ _____			
Approuvé par : Lucie Jean _____ Louise Deschênes _____ _____		Signatures :                      Date : <input checked="" type="checkbox"/> Lucie Jean                      _____ _____ <input type="checkbox"/> _____ _____ <input type="checkbox"/> _____ _____	

Titre : Échantillonnage de sols près de structures faites d'acier galvanisé dans le cadre du projet de contamination de sols au zinc pour des fins d'analyses physico-chimiques et écotoxiques.

Mots clés : Échantillons, pylônes électriques, zinc, métaux, propriétés texturales, pH, matière organique.

## OBJECTIF

Ce protocole explique la méthodologie utilisée pour échantillonner des sols contaminés au zinc près des structures métalliques galvanisées dans le but d'en analyser les propriétés physico-chimiques et écotoxiques. Le procédé de galvanisation consiste à recouvrir des pièces ou des structures métalliques de zinc fondu à chaud ou par immersion dans des bains spécialisés; les métaux galvanisés sont donc protégés des processus d'oxydation et les réactions de corrosion en sont alors considérablement ralenties.

Les pylônes des lignes de transmission au Québec constituent des structures galvanisées intéressantes pour ce projet; en effet, d'année en année, l'acidité des pluies, si faible soit-elle, causent une corrosion graduelle de la couche galvanisée entraînant ainsi un apport lent et localisé de zinc dans le sol de surface situé sur les zones d'égouttement des pylônes. Avec le temps, les concentrations localisées de zinc dans le sol dépassent souvent le critère générique B (500 ppm) et plus rarement le critère générique C (1500 ppm) établi par le MDDEP<sup>10</sup> (Lock and Janssen 2005).

Dans le cadre de ce projet, une quinzaine de pylônes seront sélectionnés. Pour chacun des pylônes ciblés, un échantillon de sol sera récolté dans les zones d'égouttement de la structure métallique et un échantillon de sol de référence (blanc de terrain, non-contaminé) sera récolté à quelques mètres du pylône. La Figure A1-1 présente la localisation générale des zones d'égouttement de la structure métallique et des zones de référence. Il faut accorder une attention particulière à l'échantillonnage du sol selon ce schéma, car les sections entourant les pieds du pylône ont été remblayées et ce remblai n'a pas toujours les mêmes propriétés texturales et chimiques que le sol d'origine. Il est donc essentiel de respecter la procédure décrite dans ce protocole afin d'échantillonner des sols contaminés et des sols de référence de mêmes propriétés physico-chimiques.

Le choix des échantillons repose sur la variété des types de sols retrouvés dans les régions habitées du Québec. La plupart des échantillons proviendront de la grande région métropolitaine de Montréal (Lanaudière, Laurentides, Montérégie, Île de Montréal, Laval) et deux paires d'échantillons proviendront de la forêt boréale, où les sols sont habituellement plus acides. De plus, suite à la tempête du verglas de 1998, de nombreux pylônes se sont effondrés et ont été remplacés par des nouveaux; il serait donc intéressant d'en trouver au moins deux et d'en prélever des échantillons afin d'observer l'effet du temps sur le niveau de contamination et de toxicité du zinc.

---

<sup>10</sup> Tableau des critères génériques disponible à l'adresse : [http://www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe\\_2.htm](http://www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe_2.htm)

D'un point de vue logistique, environ cinq paires d'échantillons peuvent être prélevées par jour; il faut donc prévoir un minimum de 3 jours d'échantillonnage sans compter les échantillons des forêts boréales et mixtes. Si les analyses préliminaires de concentration de zinc total, de pH et de matière organique n'offrent pas une plage intéressante de données (pour éviter les biais), il faudra retourner sur le terrain pour ré-échantillonner de façon à améliorer la représentativité de la population.

## **MATÉRIEL**

### **À emporter lors de la campagne d'échantillonnage**

- Pelles (grosse, petites), de préférence en acier inoxydable
- Tamis en acier d'ouverture 2 mm
- Ustensiles de plastique (cuillères, râteau)
- Chaudières en plastique de 5L pour la conservation des échantillons (2 par pylône)
- Ruban de mesure 30 m
- Règle rigide de 30 cm
- Boussole, appareil photo
- 2 chaudières vides de 20L pour les déchets de rinçages
- 1 chaudière de 10L contenant de l'acide nitrique ~10% pour le trempage (1 L d'acide nitrique 70% qualité ACS + 6 L d'eau du robinet)
- 2 chaudières contenant ~10L d'eau purifiée (nanopure), préalablement rincées à l'acide nitrique 10% (pour le rinçage) + un contenant pour transvider lors du rinçage
- 2 chaudières de 20L d'eau du robinet avec un petit gobelet pour mouiller et rincer.
- Savon Sparkleen en solution, brosses à poils doux, poudre Sparkleen
- Papier pH
- Contenants en plastique de 50 mL avec bouchon remplis de 40 mL d'eau distillée
- Sacs Ziploc larges, sac à déchets
- Papier essuie-tout Bounty ou guenilles sans charpie
- Cahier de laboratoire, crayon
- Combinaisons de terrain, gants néoprène (noir) ou Vitex (vert)
- Lunettes de sécurité
- Gants de labo bleus
- Bottes de construction ou bottes d'hiver

- Imperméables et vêtements chauds ou crème solaire
- Cartes routières

## **MÉTHODOLOGIE**

### **Lavage des équipements d'échantillonnage**

Quelques jours avant l'échantillonnage et avant chaque prélèvement, procéder à la première et à la deuxième étape de décontamination (voir §0 et §0) de tous les équipements utilisés lors de l'échantillonnage (pelles, tamis, ustensiles en plastique, etc.). L'efficacité du nettoyage repose sur le soin qu'apporte le préleveur à chacune des étapes de la décontamination. Un rinçage adéquat consiste à mettre en contact une quantité suffisante de solvant avec les surfaces de l'équipement d'échantillonnage qui entrera en contact avec le sol. La propreté des outils utilisés pour l'échantillonnage est considérée comme un des éléments de toute première importance et une attention spéciale et constante doit être accordée à cet aspect afin de s'assurer d'éliminer tout risque de contamination croisée.

#### **Première étape**

- Rincer à l'eau du robinet pour enlever les résidus majeurs à l'aide du contenant 4 L;
- Brosser les surfaces avec une brosse à poils doux, de l'eau du robinet et un détergent sans phosphate (Sparkleen);
- Rincer à l'eau du robinet pour enlever le détergent à l'aide du contenant 4 L;
- Rincer à l'eau purifiée (nanopure), égoutter le surplus.

#### **Deuxième étape**

- Tremper à l'acide  $\text{HNO}_3$  10% pendant 3 minutes les ustensiles de plastique;
- Rincer à l'acide les pelles et tamis sans les laisser tremper (l'acide attaque l'acier);
- Rincer deux fois à l'eau purifiée de façon à enlever toute trace d'acide et égoutter le surplus.

### **Prélèvement des échantillons selon la position et la dénivellation du pylône**

Deux échantillons de sol devront être pris pour chaque pylône ciblé :

- l'échantillon contenant du zinc à une concentration supérieure au critère générique B (contaminé, i.e. 500 ppm minimum)



- l'échantillon de référence dont la concentration en zinc est près de la teneur naturelle du sol (critère générique A, i.e. 110 ppm, ou entre A-B, non contaminé).

### **Reconnaissance de terrain**

Pour chacun des pylônes sélectionnés, on débute d'abord par une reconnaissance de terrain pour cibler le pylône idéal et localiser les zones d'égouttement de ce pylône. Le pylône idéal se situe sur un terrain qui n'a pas reçu d'amendement organique ou chimique et qui n'a pas été contaminé par un agent autre que le zinc; les pylônes dans les champs agricoles (amendement) et en bordure des routes (sol remblayé et contamination multiple à l'huile, essence, sel, etc.) ne sont pas de bons candidats.

Les zones d'égouttement sont des sections dont le couvert végétal est moins dense que le reste de la base du pylône étant donné que les conditions très humides du sol limitent la croissance des végétaux. Le centre du pylône et le milieu de la transversale située entre deux pieds du pylône sont souvent des zones d'égouttement intéressantes pour l'échantillonnage du sol contaminé (voir Figure A1-1).

**MISE EN GARDE :** Il est essentiel de respecter les directives et les schémas de prélèvement pour chacun des échantillons. En effet, les quatre pieds de chacun des pylônes sont supportés par des treillis enfouis à une certaine profondeur du sol et recouvert de remblais, c'est-à-dire un sol composite qui peut avoir des propriétés texturales et chimiques différentes du sol d'origine. La superficie de la zone remblayée varie selon la famille de pylônes : les pylônes de 120 kv (petits pylônes) ont une superficie remblayée d'environ 4m x 4m autour de chaque pied alors que les pylônes de 735 kv (gros pylônes) ont une superficie remblayée d'environ 5m x 8m autour de chaque pied. **IL NE FAUT EN AUCUN CAS ÉCHANTILLONNER CE REMBLAI, MÊME SI CELUI-CI EST SITUÉ DANS UNE ZONE D'ÉGOUTTEMENT.** Par conséquent, il faudra vérifier la tension électrique supportée par les pylônes sélectionnés et estimer les sections remblayées autour des pieds pour prélever des échantillons acceptables. À noter que les superficies de remblai illustrées sur la Figure A1-1 sont conservatrices.

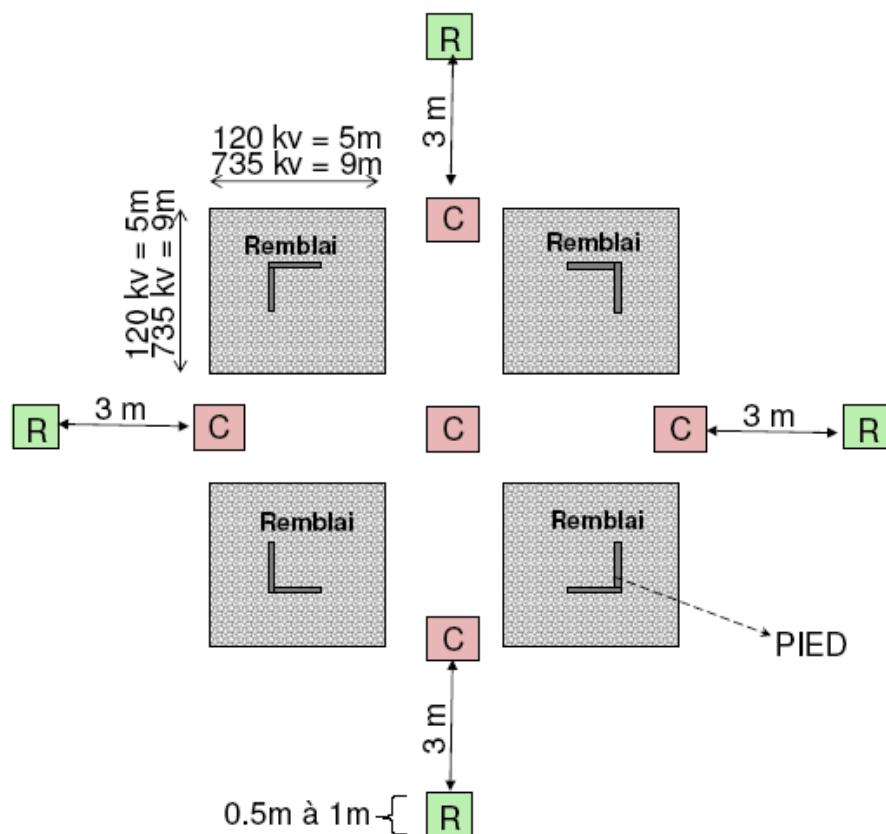


Figure A1-1 : Base et pieds du pylône et localisation du prélèvement des échantillons en vue aérienne (Légende : carré vert = échantillon de référence, carré rose = échantillon contaminé, carré gris texturisé = section remblayée)

### Échantillon de référence

À un minimum de 3 m de la base du pylône, en partant du milieu d'une transversale entre 2 pieds du pylône, délimiter un carré d'environ 0.5 à 1 m<sup>2</sup> (voir Figure A1-1). Si le pylône est situé sur un terrain en pente, il est plus sûr d'échantillonner le sol de référence à au moins 3 m de la transversale créée par les deux pieds les plus élevés du pylône (voir Figure A1-2 en annexe); ainsi, on réduit le risque de prélever un échantillon de sol contaminé au zinc suite à la percolation ou au ruissellement des eaux de pluie.

Enlever la partie visible de la végétation (pelouse, graminées) à l'aide des mains ou d'un instrument tranchant si nécessaire (ustensiles en plastique ou pelle recouverte d'un sac Ziploc); secouer les racines de la végétation arrachée sur l'aire de prélèvement afin de conserver au maximum le sol de surface;

Prélever et tamiser (2 mm) le sol de surface directement dans la chaudière en ne récoltant que la couche située à moins de 10 cm de profondeur; utiliser une règle pour vérifier la profondeur;

Si la chaudière n'est pas pleine et que tout le sol de surface situé sur l'aire délimitée a été ramassé, refaire les étapes 1 à 3 à proximité d'une autre transversale du pylône. Répéter jusqu'à ce que la chaudière soit remplie de sol compacté. Mélanger minutieusement l'échantillon composite dans la chaudière jusqu'à homogénéité. **ATTENTION DE NE PAS PRÉLEVER LE REMBLAI!**

### **Échantillon contaminé**

- Sur une zone d'égouttement située sous la base du pylône (au centre de la base préférablement ou au milieu de la transversale créée par deux pieds), vérifier visuellement la texture et la couleur du sol de surface.
- Si ce sol de surface semble avoir la même texture et la même couleur que l'échantillon de référence, délimiter une aire d'environ 0.5 à 1 m<sup>2</sup>; sinon, changer de position et refaire les étapes 5 et 6.
- Faire les étapes 2 et 3.
- Si la chaudière n'est pas pleine, refaire les étapes 5 à 7 sur une autre zone d'égouttement. Mélanger minutieusement l'échantillon composite dans la chaudière jusqu'à homogénéité. **ATTENTION DE NE PAS PRÉLEVER LE REMBLAI!**

### **Identification des lieux, de la municipalité et des échantillons**

Pour chaque pylône, remplir une nouvelle feuille de route qui sera agrafée dans le cahier de laboratoire (voir cette feuille à la fin de la section Annexe):

- Identifier chaque pylône par un numéro ID unique;
- Noter la date et l'adresse : municipalité, route(s) d'accès;
- Transcrire les inscriptions visibles sur le pylône si possible (numéro d'identification du pylône, date d'installation, etc.);
- Prendre une photo et noter au cahier le numéro de la pose;

- Faire un schéma ou un croquis de la position du pylône dans son environnement : position et distance des pieds, routes, dénivellation (l'indiquer par une flèche dont la pointe montre le sens de ruissellement), infrastructures environnantes;
- Sur le schéma du pylône, indiquer par un  $\boxed{C}$  (échantillon contaminé) ou un  $\boxed{R}$  (échantillon de référence) les endroits où les échantillons ont été prélevés;
- Inscrire les observations et commentaires complémentaires.
- Inscrire les principales informations sur la chaudière : numéro ID, ville et type d'échantillon (C ou R)

## NOTES ET RECOMMANDATIONS

- Il n'est pas nécessaire de décontaminer l'équipement lorsqu'on prélève un échantillon composite pour le même point d'échantillonnage.
- Les chaudières en plastique utilisées pour recueillir l'échantillon proviennent directement du fournisseur et n'ont jamais été utilisées; il n'est donc pas nécessaire de les laver avant usage.
- En général, le zinc du sol provenant de la corrosion de matériaux galvanisés n'est pas très mobile et reste sous la base du pylône (Fava, Fratesi et al. 2002).
- Ne pas oublier que l'échantillonnage est destructeur du point d'échantillonnage; il ne sera donc pas possible de ré-échantillonner une deuxième fois au même endroit.
- Ne pas remplir les trous créés lors de l'échantillonnage
- Les échantillons de sols doivent être entreposés à 4°C jusqu'à analyse; il est fortement recommandé de faire les analyses dans les 6 mois suivant l'échantillonnage (Csuros and Csuros 2002).

## RÉFÉRENCE(S)

Csuros, M. and C. Csuros (2002). Environmental Sampling and Analysis for Metals. Florida, U.S.A., CRC Press LLC. 372 p.

Fava, G., R. Fratesi, et al. (2002). "Soil zinc contamination from corrosion of galvanized structures." Chemistry and Ecology **18**: 3-4.

Lock, K. and C. R. Janssen (2005). "Influence of soil zinc concentrations on zinc sensitivity and functional diversity of microbial communities." Environmental Pollution **136**: 275-281.

MEF (1995). Guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales, Cahier 5, Échantillonnage des sols.

MEF (1999). Guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales, Cahier 1, Généralités.

Protocole PE32 (1998) Pré-échantillonnage et échantillonnage de six sites dans le cadre du projet pour fin d'analyse des métaux (CCA).

## SUPPLÉMENTS

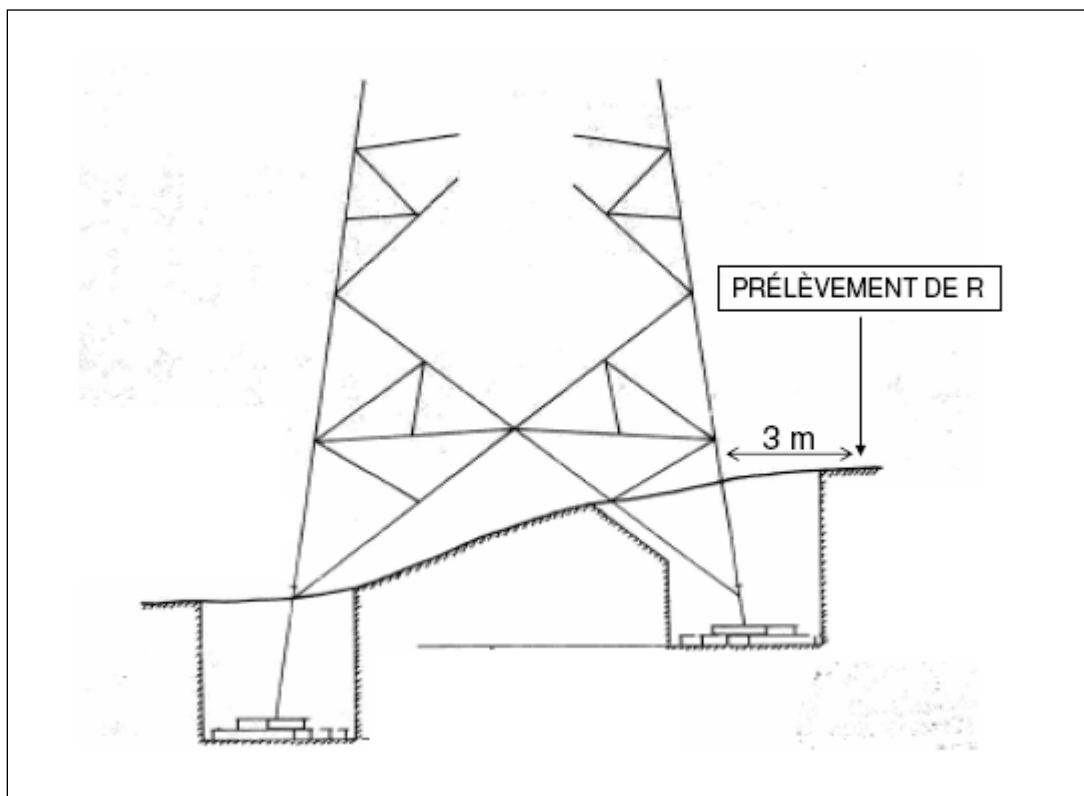


Figure A1-2 : Localisation du prélèvement de l'échantillon de référence (R) dans le cas où le pylône est installé sur un terrain en pente

Pylône ID : \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_\_\_

Ville : \_\_\_\_\_

Route(s) d'accès : \_\_\_\_\_

Photo : \_\_\_\_\_

Dénivellation : \_\_\_\_\_

Si oui, l'indiquer d'une flèche en pointant vers le sens de l'écoulement Oui Non

Inscriptions sur le pylône : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

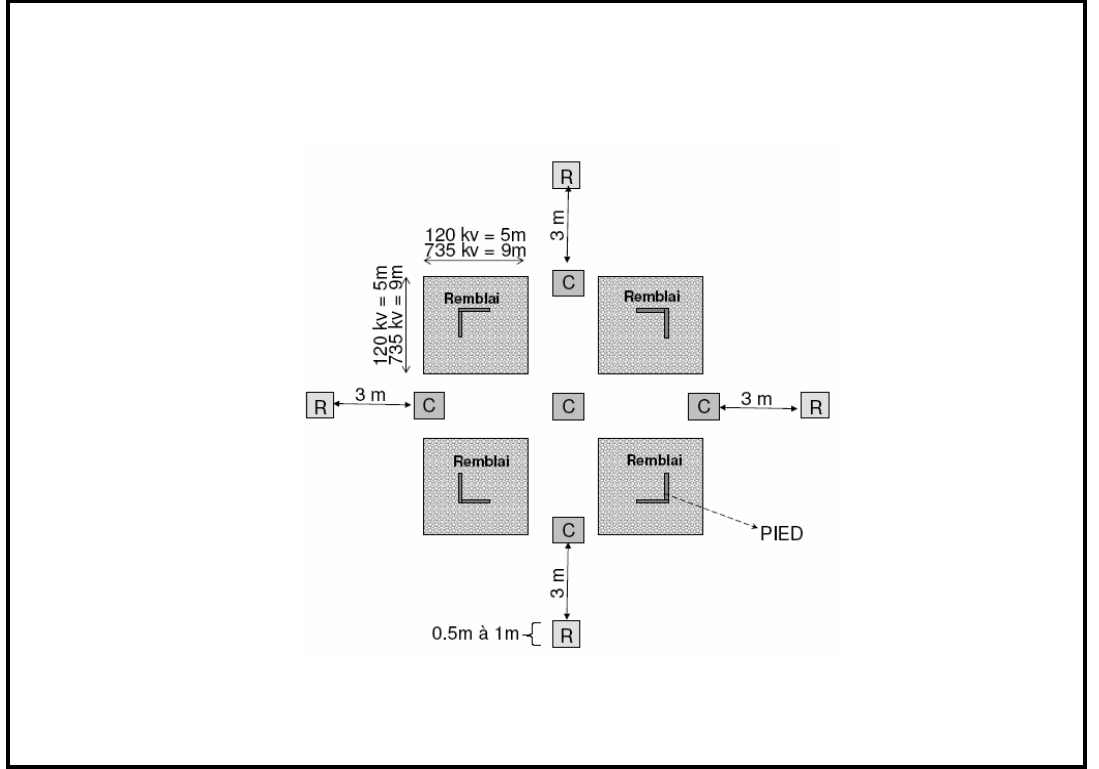
Autres observations : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Croquis:** Indiquer la position et la distance entre les pieds, les routes à proximité, la dénivellation, du terrain, les infrastructures environnantes. Marquer par une lettre encadrée les endroits échantillonnés : C (contaminé) ou R (référence). Positionner le nord magnétique.



## Annexe 2: Mesure de l'activité de l'uréase dans un sol

 <b>CIRAIG</b> Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
			
Protocole # : PE70-B		Nombre de pages : 6	
Version : 1		Date : 08/01/2008	
Auteur(s): Isabelle Lessard Valérie Bécaert			
Approuvé par : Lucie Jean		Signatures : _____ Date : _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ _____	
Titre : Mesure de l'activité de l'uréase dans un sol			
Mots clés : uréase, sol, activité enzymatique			

**OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. L'enzyme testé est un représentant du cycle de l'azote et hydrolyse l'urée dont la source est supposée d'être principalement d'origine microbienne. De l'eau millipore est utilisée pour la préparation de toutes les solutions puisque le projet est réalisé dans le contexte d'une contamination métallique et qu'il est important d'utiliser des solutions exemptes de métaux. Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenus dans les sols, le principe sur lequel repose le protocole proposé est la mesure du potentiel d'activité enzymatique : on introduit dans un échantillon de sol un substrat ciblé par l'enzyme testé puis on mesure, après une période d'incubation à une température donnée, les produits de la transformation enzymatique. Cependant, ce protocole inclut aussi l'analyse de l'activité enzymatique sans tampon, correspondant à l'activité enzymatique 'réelle' du sol (Kandeler & Öhlinger, 1996); les autres conditions expérimentales



ne sont pas modifiées (température, substrat, temps d'incubation, etc.). Les essais avec et sans tampon sont réalisés en parallèle pour chaque sol testé.

## URÉASE

### Matériels

- HCl 1M (Anachemia, 46396-460 FW 36.46)
- NaOH 10M (Anachemia, 83076-300, FW 40)
- NaOH 3M (Anachemia, 83076-300, FW 40)
- 6 ballons de 50 mL
- 3 ballons de 1 L
- 3 ballons de 25 mL
- 3 ballons de 100 mL
- 5 erlenmeyers de 50 mL
- Tubes eppendorf
- Pipettes P20, P5000 et multicanaux (model 8800, Nichityo)
- Pipette gradué de 25ml
- Microplaque à fond plat transparente (Costar 96wells, Fisher)
- Lecteur microplaque (GENios, Tecan)
- Incubateur tempéré à 37°C
- Balance  $\pm 0,0001$  (Mettler Toledo)
- 1 seringue de 5 mL
- Tetraborate de sodium (FW 381.37, Anachemia, AC-8262)
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Anachemia, AC-0611, FW 53.49)
- Urée (Anachemia, AC-9700, FW 60.06)
- KCl (Anachemia, 72830-380, FW 74.55)
- salicylate de sodium (JT Baker, 3872-01, FW 160.10)
- sodium nitro-prusside (sodium nitrofericyanide) (Sigma, 431451, FW 297.95)
- dichloroisocyanurate de sodium (attention peut brûler, à manipuler avec ventilation, tenir loin du feu) (Sigma, D2536, FW 219.90).

## Préparation des solutions

### NaOH (3M)

- Dissoudre 120 g de NaOH dans de l'eau distillée et diluer à 1 L.

### Solution de tampon borate (0,1M, pH10)

- Dans un bécher de 2L, dissoudre 76.2740g de Tetraborate de sodium dans de l'eau déionisée.
- Chauffer si nécessaire afin d'obtenir une dissolution complète.
- Refroidir à la température de la pièce et ajuster le pH à 10 avec la solution de NaOH 3M.
- Transférer dans un ballon de 2L.
- Ajuster le volume jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

### Solution de substrat dans le tampon borate (720 mM), pour 20 échantillons :

- Dans un bécher de 50 mL, dissoudre 1.08 g d'*urée* dans le tampon borate (0,1M, pH10).
- Transférer dans un ballon de 25 mL et compléter au trait de jauge avec le tampon.
- **Préparer ce réactif le jour même.**

### Solution de substrat dans de l'eau déionisée (720 mM), pour 20 échantillons :

- Dans un bécher de 50 mL, dissoudre 1.08 g d'*urée* dans de l'eau déionisée (0,1M, pH10).
- Transférer dans un ballon de 25 mL et compléter au trait de jauge avec de l'eau.
- **Préparer ce réactif le jour même.**

### HCl (1M)

- Pour la production de 1 L, ajouter 82,5 mL de HCl concentré à 0,5 L d'eau distillée dans un ballon de 1 L.
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée

### Solution de chlorure de potassium KCl (1M) :

- Dans un bécher de 2L, dissoudre 149,2 g de KCl dans de l'eau déionisée.
- À l'aide d'une pipette graduée de 25 ml, ajouter 20 mL d'HCl 1M.
- Transférer dans un ballon de 2L.
- Ajuster le volume jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

- Garder cette solution quelques semaines seulement.

**Solution de NaOH (0,3M) :**

- À l'aide d'un cylindre gradué de 50 mL, mesurer 25 mL de NaOH 3M et transférer dans un ballon de 250 mL.
- Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.

**Solution de Salicylate de sodium pour une analyse et une c. c. (1,06M) :**

- Dissoudre 4,25 g de *salicylate de sodium* dans un ballon de 25 mL.
- Ajouter 30 mg de sodium *nitro-prusside*.
- Ajuster jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.
- **Préparer ce réactif juste avant l'analyse.**

**Réactif A (à préparer pendant l'incubation):**

- Dans un bécher de 100 mL, mélanger 25 mL de NaOH 0,3M, 25 mL de solution de salicylate de sodium et 25 mL d'eau distillée.
- **Préparer ce réactif juste avant l'analyse.**

**Réactif B : Solution de dichloroisocyanurate pour une analyse et une c. c. (4.5mM), à préparer pendant l'incubation :**

- Dans un ballon de 25 mL, dissoudre 25 mg de *dichloroisocyanurate de sodium* dans de l'eau distillée et ajuster au trait de jauge.
- **Préparer ce réactif le jour même.**

**Solution standard stock (1000 $\mu$ g NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N ml<sup>-1</sup>):**

- Dans un ballon de 1 L, dissoudre 3,8207g de NH<sub>4</sub>Cl dans de l'eau distillée et ajuster jusqu'au trait de jauge.
- Garder cette solution à 4°C.

**Standards de calibration :**

- Avec une P5000, pipeter 0 (blanc), 0.5, 0.75, 1 et 1.25mL de solution stock dans des ballons de 50 mL et ajuster le volume au trait de jauge avec la solution de chlorure de potassium.

- Les standards contiennent 0, 10, 15, 20 et 25  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N mL}^{-1}$ .

## **Méthodologie**

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Il faut préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Préparation du filtrat qui contient le produit de l'activité de l'uréase, 3) Traiter le filtrat avec un réactif coloré pour mesure photométrique, 4) Préparation de la courbe de calibration pour effectuer les calculs.

### **Préparation du sol et incubation avec substrat**

- Peser 1g de sol humide dans 5 erlenmeyers de 50 mL (3 échantillons et 2 contrôles).
- Avec une dispensette de 10ml, ajouter 4mL de tampon borate dans tous les erlenmeyers.
- Avec une pipette de 1mL, ajouter 500 $\mu\text{L}$  de la solution de substrat dans trois erlenmeyers (échantillons).
- Agiter brièvement, sceller et incuber pour **2h à 37°C**.

### **Préparation du filtrat après incubation**

- Ajouter 6mL de solution de chlorure de potassium dans tous les erlenmeyers et mélanger pendant 30 minutes sur un agitateur rotatif à une vitesse de 100 rpm.
- Après agitation, ajouter à l'aide d'une P1000, 500 $\mu\text{L}$  de substrat dans les contrôles.
- Transférer le surnageant dans des tubes Eppendorf de 2mL.
- Centrifuger à 20 000g pendant 5 min.

### **Analyses photométriques des échantillons et des standards de calibration**

- Pipeter 20  $\mu\text{L}$  avec une pipette P20 d'échantillons et des standards dans les puits de la microplaque.
- Ajouter, à l'aide d'une pipette multicanaux, 180  $\mu\text{L}$  d'eau distillée dans les puits.
- Ajouter, à l'aide d'une pipette multicanaux, 100  $\mu\text{L}$  du réactif A dans les puits.
- Ajouter, à l'aide d'une pipette multicanaux, 40  $\mu\text{L}$  de réactif B (solution de dichloroisocyanurate) dans les puits.
- Bien mélanger.
- Laisser décanter pendant 30 minutes à la température ambiante.
- Lecture à 685 nm.

## Calcul

Calculer les concentrations à partir de la courbe de calibration

$$\frac{(S-C) \cdot V}{PS} = \mu\text{g NH}_4^+-\text{N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$$

PS

S valeur moyenne des échantillons (  $\mu\text{g NH}_4^+-\text{N ml}^{-1}$  )

C valeur moyenne des contrôles (  $\mu\text{g NH}_4^+-\text{N ml}^{-1}$  )

V volume de solution d'incubation = 10.5mL  
(4mL tampon+0.5mL substrat+6 mL KCl)

PS poids sec du sol (g)


## Notes

- Si nécessaire les filtrats peuvent être entreposés pendant une nuit à 4°C
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 3.5  $\mu\text{g N} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Si l'intensité de la couleur des filtrats n'est pas dans cette limite, ils doivent être dilués avec de l'eau distillée.
- Le complexe coloré est stable pendant 8 heures.

## Références

Kandeler, E., & Öhlinger, R. (1996). Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism. In F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler & R. Margesin (Eds.), *Methods in Soil Biology* (pp. 162-184). Berlin: Springer.

## Annexe 3: Mesure de l'activité de la protéase dans les sols

 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; text-align: left;"> <b>CIRAIG</b>  <small>Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services</small> </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> <b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b> </div>									
									
Protocole # :PE70-C	Nombre de pages : 6								
Version :1	Date 08/01/08								
Auteur(s):Lucie Jean Valérie Bécaert									
Approuvé par : Louise Deschênes Isabelle Lessard	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: left; width: 70%;">Signatures :</th> <th style="text-align: left; width: 30%;">Date :</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> _____         </td> <td style="padding: 5px;">           _____         </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> _____         </td> <td style="padding: 5px;">           _____         </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> _____         </td> <td style="padding: 5px;">           _____         </td> </tr> </table>	Signatures :	Date :	<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> _____	_____	<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> _____	_____	<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> _____	_____
Signatures :	Date :								
<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> _____	_____								
<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> _____	_____								
<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> _____	_____								

Titre : Mesure de l'activité de la protéase dans les sols
Mots clés :     protéase

**OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. L'enzyme testée, la protéase, décompose les protéines du sol pour former des oligopeptides (chaîne de moins d'une dizaine d'acides aminés) qui seront éventuellement assimilés par les micro-organismes du sol comme source d'énergie ou comme molécules utiles pour la synthèse de nouvelles protéines. De l'eau millipore est utilisée pour la préparation de toutes les solutions puisque le projet est réalisé dans le contexte d'une

contamination métallique et qu'il est important d'utiliser des solutions exemptes de métaux. Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenus dans les sols, le principe sur lequel repose chacun des protocoles proposés est la mesure du potentiel d'activité enzymatique : on introduit dans un échantillon de sol un substrat ciblé par l'enzyme testé et on mesure après une période d'incubation les produits de la transformation enzymatique (Schinner, Öhlinger, Kandeler, & Margesin, 1996). Cependant, ce protocole inclut aussi l'analyse de l'activité enzymatique sans tampon, correspondant à l'activité enzymatique 'réelle' du sol (Kandeler & Öhlinger, 1996); les autres conditions expérimentales ne sont pas modifiées (température, substrat, temps d'incubation, etc.). Les essais avec et sans tampon sont réalisés en parallèle pour chaque sol testé.

## **PROTÉASE**

### **Matériels**

- Lecteur microplaque (GENios, Tecan)
- Un agitateur rotatif tempéré
- HCl 1M
- NaOH 0,1 M
- 4 Ballons de 1litre
- 2 ballons de 100 mL
- 1 ballon de 200 mL
- 1 bécher de 200 mL
- 1 ballon de 10 mL
- 5 erlenmeyers de 25 mL
- Micropipette P200
- Dispensette multichannel (Nichiryo,model 8800)
- Microplaque transparente 96 puits à fond plat
- tris (hydroxymethyl)aminomethane (Anachemia, 95266, FW 121.14)
- caséine (sodium-salt, Sigma C-2649)
- $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCA) (Anachemia 93610, FW 163.39)
- carbonate de sodium anhydre (Fisher S263, FW 105.99)
- copper(II)sulfate pentahydrate (Anachemia 28824, FW 249.68)
- sodium potassium tartate ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Anachemia AC-7738)
- Folin Ciocalteu's phenol reagent (Merck, 9001 ou Sigma F-9252)

- Tyrosine (Aldrich T9040-9, FW 181.19)

### **Préparation des solutions**

#### **Tampon tris (0.05M, pH 8,1) :**

- Peser 12,12g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane dans un bécher de 2L.
- Ajuster le pH à 8,1 avec 1M HCl
- Transférer dans un ballon de 2L et compléter au trait de jauge avec de l'eau déionisée.
- Répéter les étapes 1 à 4 pour obtenir 4L de tampon Tris.
- Garder la solution à 4°C.

#### **Solution de substrat dans le tampon pour une analyse et une courbe de calibration (2% w/v) :**

- Dans un bécher de 250mL, peser 5g de caséine et ajouter du tampon Tris
- Ajouter un barreau magnétique puis agiter à l'aide d'une plaque chauffante agitatrice.
- Mélanger la suspension à 50°C jusqu'à ce que la caséine soit dissoute.
- Transférer dans un ballon de 250mL et compléter au trait de jauge avec du tampon Tris.
- **Préparer, ce réactif la journée même.**

#### **Solution de substrat dans l'eau pour une analyse et une courbe de calibration (2% w/v) :**

- Refaire la procédure précédente en remplaçant le tampon par de l'eau.

#### **Solution d'acide trichloroacétique (TCA, 0,92M) :**

- Peser 300 g de  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCA) dans un ballon de 2L.
- Dissoudre et diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

#### **Réactif A :**

- Peser 25 g de carbonate de sodium (water-free) dans un ballon de 500mL
- Ajouter 30 mL de NaOH 0,1M,
- Dissoudre dans 300 mL d'eau distillée, ajuster le volume au trait de jauge.
- Garder la solution à 4°C au maximum 3 semaines.



**Réactif B :**

- Peser 0.5 g de copper(II)sulfate pentahydrate dans un ballon de 100mL
- Dissoudre et diluer avec de l'eau distillée.
- Garder à 4°C au maximum 3 semaines.

**Réactif C :**

- Peser 1g de sodium potassium tartate ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ) dans un ballon de 100mL.
- Dissoudre et diluer avec de l'eau distillée.
- Garder à 4°C pour quelques jours.

**Réactif alcali pour une analyse et une courbe de calibration (solution de travail) :**

- Mélanger 50mL de réactif A, 1mL de réactif B et 1mL de réactif C dans un bécher.
- **Préparer cette solution le jour même.**

**Réactif de phénol Folin-Ciocalteu pour une analyse et une courbe de calibration :**

- Pipeter 10 mL de Folin Ciocalteu's phenol reagent (Merck, 9001 ou Sigma F-9252) dans un ballon de 100 mL et diluer avec eau distillée.

**Solution standard stock pour une courbe ( 500 µg de tyrosine/mL):**

- Peser 50mg de tyrosine dans un ballon de 100mL et dissoudre dans le tampon tris.
- Si nécessaire, chauffer pour dissolution complète.
- Ajuster au trait de jauge avec du tampon tris.
- Garder la solution à 4°C pour quelques jours seulement.

**Standard de calibration :**

- Pipeter 0, 0.2, 0.5, 1, 2 et 3 mL de la solution stock dans six éprouvettes jetables,
- Ajuster les volumes à 5 mL avec le tampon tris, (ajouter dans le même ordre que précédemment : 5, 4.8, 4.5, 4, 3, 2mL).
- Ajouter 5mL de solution de substrat et 5mL de solution TCA.
- Les standards de calibration contiennent 0 (blanc), 100, 250, 500, 1000 et 1500µg de tyrosine.

## Méthode

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Il faut préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Préparation du filtrat qui contient le produit de l'activité de la protéase, 3) Traiter le filtrat avec un réactif coloré pour mesure photométrique, 4) Préparation de la courbe de calibration pour effectuer les calculs.

### Préparation du sol et incubation avec substrat

- Peser 1g de sol humide dans cinq erlenmeyers de 25 mL (3 échantillons et 2 contrôles).
- Ajouter 5 mL de solution substrat et 5 mL de tampon tris dans trois erlenmeyers (échantillons).
- Pipeter seulement 5mL de tampon tris dans les deux autres (contrôles).
- Agiter les flacons brièvement, sceller avec des « rubber stoppers » et incuber pour **2h à 50°C sur un agitateur rotatif**.

### Préparation du filtrat après incubation

- Pipeter 5 mL (avec une P5000) de substrat dans les deux contrôles,
- Mélanger brièvement
- Ajouter 5 mL (avec une P5000) de TCA dans les cinq erlenmeyers.
- Agiter brièvement, transférer dans des tubes Eppendorf 1,5ml et centrifuger à 20 000g pendant 5min.

### Analyses photométrique du filtrat

- Pipeter 50 µL (avec micropipette P200) de filtrat dans un des puits de la microplaque.
- Ajouter 75 µL (avec une dispensette multichannel) de réactif alcali dans les puits de la microplaque.
- Bien mélanger
- Ajouter 50 µL (avec une dispensette multichannel) de Folin Ciocalteu's phenol reagent, mélanger encore.
- Si un précipité est formé après 1h, filtrer ou centrifuger la solution.
- Laisser reposer 90 min à la température de la pièce pour le développement de la couleur.
- Dans les prochaine 90 min mesurer l'extinction des standards, des échantillons et des contrôles contre le blanc à 700 nm.

### Courbe de calibration

- Centrifuger les standards de calibration.
- Pipeter 50  $\mu\text{L}$  (avec micropipette P200) de filtrat dans un des puits de la microplaque.
- Ajouter 75  $\mu\text{L}$  (avec une dispensette multichannel) de réactif alcali dans les puits de la microplaque.
- Bien mélanger.
- Ajouter 50  $\mu\text{L}$  (avec une dispensette multichannel) de Folin Ciocalteu's phenol reagent, mélanger encore.
- Si un précipité est formé après 1h, filtrer ou centrifuger la solution.
- Laisser reposer 90 min à la température de la pièce pour le développement de la couleur.
- Dans les prochaines 90 min, mesurer l'extinction des standards, des échantillons et des contrôles contre le blanc à 700 nm..

### 3. CALCUL

L'activité de la protéase est exprimée en  $\mu\text{g}$  de tyrosine équivalent (tyr) par gramme de matière sèche et temps d'incubation. L'équivalent tyrosine est calculé à partir de la courbe de calibration.

$$\frac{(S-C)}{PS} = \mu\text{g tyrosine} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$$

S	valeur moyenne des échantillons ( $\mu\text{g tyr ml}^{-1}$ )
C	valeur moyenne des contrôles ( $\mu\text{g tyr ml}^{-1}$ )
PS	poids du sol sec (g)

#### Note :

- Le TCA est utilisé pour faire précipiter le restant de substrat après incubation.
- Il est possible de garder les filtrats à 4°C pendant 5h
- Si la concentration en tyrosine dépasse la courbe de calibration, réduire le temps d'incubation à 1h.

#### 4. RÉFÉRENCES

Ladd JN, Butler JHA (1972) Short-term assay of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4: 19-39.

Tiré de Schinner et al. 1997.

Kandeler, E., & Öhlinger, R. (1996). Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism. In F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler & R. Margesin (Eds.), *Methods in Soil Biology* (pp. 162-184). Berlin: Springer.

Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., & Margesin, R. (1996). *Methods in Soil Biology*. Germany: Springer.

## Annexe 4: Mesure de l'activité de l'arylsulfatase dans les sols

 <b>CIRAIG</b> Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
			
Protocole # : PE70-D		Nombre de pages : 7	
Version : 1		Date : 09/01/08	
Auteur(s): Lucie Jean _____ _____			
Approuvé par : Isabelle Lessard Louise Deschênes		Signatures : _____ Date : _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ _____	
Titre : Mesure de l'activité de l'arylsulfatase dans un sol			
Mots clés : arylsulfatase, sol, activité enzymatique			

**OBJECTIFS**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol selon la procédure de (Tejada, Hernandez, & Garcia, 2006). L'enzyme testé est un représentant du cycle du soufre. Les sulfatases sont principalement d'origine microbienne et sont fortement corrélées à la matière organique du sol (Schinner, Öhlinger, Kandeler, & Margesin, 1996). De l'eau millipore est utilisée pour la préparation de toutes les solutions puisque le projet est réalisé dans le contexte d'une contamination métallique et qu'il est important d'utiliser des solutions exemptes de métaux. Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenus dans les sols, le principe sur lequel repose ce protocole est la mesure du potentiel d'activité enzymatique : on introduit dans un échantillon de sol un substrat ciblé par l'enzyme testé puis on mesure, après une période d'incubation à une température donnée, les produits de la transformation enzymatique. Cependant, ce protocole inclut aussi l'analyse de l'activité enzymatique sans tampon, correspondant à l'activité enzymatique 'réelle' du sol (Kandeler & Öhlinger, 1996); les autres

conditions expérimentales ne sont pas modifiées (température, substrat, temps d'incubation, etc.). Les essais avec et sans tampon sont réalisés en parallèle pour chaque sol testé.

## ARYLSULFATASE

### Matériels

- Incubator shaker (New Brunswick scientific, Innova 4000, U.S.A);
- Centrifugeuse sur table (IEC);
- Lecteur microplaque (GENios, Tecan);
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- Balance précision 0,0001 (Mettler toledo, AB204, Switzerland);
- Balance précision 0,01 (Mettler toledo);
- 40 erlenmeyers de 50mL;
- 1 ballon et bécher de 2L;
- 2 ballons de 1L;
- ballons de 50 ml et de 500mL;
- 6 béchers de 50 mL;
- 1 microplaque transparente 96 puits à fond plat;
- pipette pasteur;
- Micropipette P1000, P5000 et embouts;
- Dispensette graduée de 2 et 10mL;
- Dispensette multichannel (Nichiryo, model 8800)
- Bouteille ambrée de 1L;
- Tubes eppendorf de 2mL;
- Acétate de sodium trihydrate (Anachemia, 79948-300, FW 136.08);
- Acide acétique concentré (Fisher, UN-2789);
- *Potassium-p-nitrophenylsulfate* (Sigma, N-3877, FW 257.27);
- NaOH (Anachemia, AC-8370);
- Chlorure de calcium dihydrate (Anachemia, 18706-300, FW 147.01);
- *p-nitrophenol* (Anachemia, 63802-100, FW 139.11).

## Préparation des solutions

### Tampon Acétate (0.5 M, pH 5.8), pour 20 échantillons :

- Dans un bécher de 250mL, dissoudre 6.4g d'acétate de *sodium trihydrate* dans 60mL d'eau déionisée.
- Ajuster le pH à 5.8 avec de l'acide acétique concentré pipeté goutte à goutte avec une pipette pasteur en agitant avec un barreau magnétique et en suivant l'évolution du pH avec le pH-mètre.
- Transférer dans un ballon de 100mL et compléter jusqu'au trait de jauge.
- **Préparer la solution le jour même.**

### Solution de substrat dans du tampon (0.02M), pour 20 échantillons :

- Peser 128,8 mg de *potassium-p-nitrophenylsulfate* dans un ballon de 25mL.
- Diluer dans le tampon acétate et ajuster le volume au trait de jauge à 25mL avec le tampon.
- **Préparer la solution le jour même.**
- *ATTENTION : le substrat est sensible à la lumière et à la température.*

### Solution de substrat dans de l'eau déionisée (0.02M), pour 20 échantillons :

- Peser 128,8 mg de *potassium-p-nitrophenylsulfate* dans un ballon de 25mL.
- Diluer dans de l'eau déionisée et ajuster le volume au trait de jauge à 25mL avec l'eau.
- **Préparer la solution le jour même.**
- *ATTENTION : le substrat est sensible à la lumière et à la température.*

### Solution de Chlorure de calcium $\text{CaCl}_2$ (0,5M)

- Dans un ballon de 500mL, peser 36,74g de  $\text{CaCl}_2$  dihydrate.
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée
- *ATTENTION* aux bulles quand on ajoute l'eau, il y a du chlore qui se libère, alors faire le mélange sous une hotte.

### Solution d'hydroxyde de sodium (0.5M) :

- Peser 20g de  $\text{NaOH}$  dans une cupule de plastique.

- Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L et ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- Répéter les étapes 1 et 2 à deux reprises pour obtenir un volume total de 3L.

**Solution standard stock (1mg p-nitrophenol·ml<sup>-1</sup>): même que pour phosphatase**

- Peser 1g de *p-nitrophenol* dans une cupule de plastique.
- Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L
- Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.
- Garder cette solution à 4°C dans un contenant ambré.

**Standard de travail pour une courbe de calibration (0.1mg p-nitrophenol·ml<sup>-1</sup>) :**

- Pipeter 5mL avec une micropipette P1000 de la solution stock dans un ballon de 50mL
- Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.
- Transvider dans un bécher.
- **Préparer la solution le jour même.**

**Standard de calibration :**

- Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5mL du standard de travail dans des erlenmeyers de 50mL.
- Ajuster les volumes à 5mL avec de l'eau distillée en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0mL avec une P5000.
- Ajouter 1mL de CaCl<sub>2</sub> (0,5M). Il est important d'ajouter le CaCl<sub>2</sub> avant le NaOH
- Ajouter 10mL avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium (0,5M).
- Transférer dans les tubes Eppendorf 2mL et centrifuger à 20000g pendant 5min.
- Les standards de calibration contiennent 0, 6.25, 12.5, 18.75, 25 et 31.25 µg de p-nitrophenol par mL.

**Méthode**

Les mesures sont effectuées en quatre étapes :



1) Préparer les échantillons de sol avec le substrat et les incubes durant 2 heures à 37°C 2) Préparer le filtrat qui contient le produit de l'activité de l'arylsulfatase, 3) Traiter le filtrat avec un réactif coloré pour mesure photométrique, 4) Préparer la courbe de calibration pour effectuer les calculs.

### **Préparation du sol et incubation avec substrat**

- Peser 1g de sol humide dans cinq erlenmeyers de 50mL.
- Avec une dispensette de 10mL, ajouter 4mL du tampon acétate dans chaque erlenmeyer.
- Agiter brièvement et équilibrer les échantillons pendant 30 minutes en les plaçant dans l'incubateur à 37°C.
- Avec une pipette P1000, ajouter 1mL de la solution de substrat dans les trois premiers erlenmeyers.
- Remettre les échantillons dans l'incubateur et incubes pendant 2h à 37°C.

### **Préparation du filtrat après incubation**

- Avec la dispensette de 2mL, ajouter 1mL de chlorure de calcium (0.5M) dans tous les erlenmeyers. *ATTENTION* il est très important d'ajouter le  $\text{CaCl}_2$  avant le NaOH.
- Avec la dispensette de 10mL, ajouter 10mL de NaOH (0,5M) dans tous les erlenmeyers.
- Avec une P1000, ajouter 1mL de solution substrat correspondant dans les contrôles.
- Agiter les erlenmeyers,
- Transférer dans les tubes Eppendorf de 2mL et centrifuger à 20000g pendant 5min.
- Prélever 250µl d'échantillons et transférer sur une microplaque 96puits.

### **Analyses photométrique du filtrat Analyses photométrique du filtrat**

- Mesurer l'extinction en absorbance à **420nm** avec un lecteur microplaque contre le blanc.

### 3. CALCUL

Calculer les concentrations of p-nitrophenol (pNP) à partir des courbes de calibration.

$$\frac{(S-C)*V}{PS} = \mu\text{g pNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot 2\text{h}^{-1}$$

S	valeur moyenne des échantillons ( $\mu\text{g pNP/mL}$ )
C	valeur moyenne des contrôles ( $\mu\text{g pNP/mL}$ )
V	volume de solution d'incubation = 16mL  (4mL tampon + 1mL substrat + 1mL $\text{CaCl}_2$ + 10mL NaOH)
PS	poids du sol sec (g)

### Notes

- Le substrat est sensible à la chaleur et à la lumière, les flacons doivent être recouverts d'aluminium.
- Mesurer l'extinction dans les 6 premières heures.
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 120  $\mu\text{g p-nitrophenol}$

### 3. RÉFÉRENCES

Kandeler, E., & Öhlinger, R. (1996). Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism. In F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler & R. Margesin (Eds.), *Methods in Soil Biology* (pp. 162-184). Berlin: Springer.

Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., & Margesin, D. R. (1996). *Methods in Soil Biology*. Heidelberg: Springer.

Tejada, M., Hernandez, M. T., & Garcia, C. (2006). Application of Two Organic Amendments on Soil Restoration: Effects on the Soil Biological Properties. *J Environ Qual*, 35(4), 1010-1017.

## Annexe 5: Mesure de l'activité de la phosphatase dans les sols

 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; text-align: left;"> <b>CIRAIG</b>  <small>Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services</small> </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> <b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b> </div>	
	
Protocole # :PE70-E	Nombre de pages :7
Version :1	Date :15/01/08
Auteur(s): Isabelle Lessard Valérie Bécaert	
Approuvé par : Lucie Jean <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 5px 0;"/> <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 5px 0;"/> <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 5px 0;"/>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;">         Signatures :         Date :       </div> <div style="margin-top: 5px;"> <input type="checkbox"/> _____       </div> <div style="margin-top: 10px;"> <input type="checkbox"/> _____       </div> <div style="margin-top: 10px;"> <input type="checkbox"/> _____       </div>

Titre : Mesure de l'activité de la phosphatase dans un sol.
Mots clés : phosphatase, enzymes, activité enzymatique, contamination métallique

**OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique de la phosphatase dans un sol contaminé par un métal. Cette enzyme est liée au cycle du phosphore. La phosphatase est importante pour la nutrition des plantes. La phosphomonoestérase (autre nom de la phosphatase) peut avoir 2 pH optimum, mais ce protocole ne présente que la phosphatase acide. De l'eau millipore est utilisée pour la préparation de toutes les solutions puisque le projet est réalisé dans le contexte d'une contamination métallique et qu'il est important d'utiliser des solutions exemptes de métaux. Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenues dans les sols, ce protocole mesure un potentiel d'activité enzymatique; on

introduit dans un échantillon de sol le substrat ciblé par l'enzyme testé et on mesure après une période d'incubation les produits de la transformation enzymatique. Cependant, ce protocole inclut aussi l'analyse de l'activité enzymatique sans tampon, correspondant à l'activité enzymatique 'réelle' du sol (Kandeler & Öhlinger, 1996); les autres conditions expérimentales ne sont pas modifiées (température, substrat, temps d'incubation, etc.). Les essais avec et sans tampon sont réalisés en parallèle pour chaque sol testé.

## PHOSPHATASE

### Matériels

- 5 erlemeyers de 100 mL
- 2 ballons de 1 litre
- 2 ballons de 500 mL
- 1 ballon de 250 mL
- 1 ballon de 100 mL
- 1 ballon de 50 mL
- 1 ballon de 25 mL
- Tubes eppendorf de 2 mL
- Pipettes P20, P1000, P5000 et multicanaux (model 8800, Nichityo)
- Dispensette de 10 mL et de 100 mL
- Microplaque à fond plat transparente (Costar 96wells, Fisher)
- Lecteur microplaque (GENios, Tecan)
- Incubateur tempéré à 37°C
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- Balance  $\pm 0.0001$  (Mettler Toledo);
- 4-nitrophenyl-phosphate (ou p-nitrophenyl-phosphate), disodium salt hexahydrate (Sigma, N4645-5G, FW 371.14) **ATTENTION** : Entreposer à -20°C dans un dessiccateur. Manipuler avec ventilation et sensible à la lumière
- Acide chlorhydrique concentré
- Chlorure de calcium dihydrate (Anachemia, 18706-380, FW 147.01)
- tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Anachemia, 95266-300, FW 121.14)
- NaOH (Anachemia, 83076-380, FW 40.00)
- Acide malique (FW 116.08, 63190, Fluka)

- Acide citrique anhydre (FW 192.13, AC2513, Anachemia)
- Acide borique (FW 61.83, AC1309, Anachemia)
- p-nitrophenol (Sigma, 104-8, FW 139.11)

### **Préparation des solutions**

#### **NaOH (1M)**

- Peser 10 g de *NaOH* dans une cupule de plastique.
- Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 250 mL et ajouter de l'eau millipore jusqu'au trait de jauge.
- Cette solution est utilisée seulement pour la préparation du Tampon Universel Stock.

#### **Tampon Universel, solution stock**

- Dans un ballon de 500 mL, dissoudre dans 250 mL d'une solution de NaOH 1M, sous la hotte:
  - 6.05 g de tri(hydroxyméthylaminométhane)
  - 5.8 g d'acide malique
  - 7.0 g d'acide citrique anhydre
  - 3.15 g d'acide borique
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau millipore.
- Garder cette solution à 4°C pendant 2 semaines.

#### **Tampon universel acide (pH 6.5), pour 20 échantillons :**

- Mélanger dans un bécher de 250 mL
  - 20 mL de Tampon universel
  - 50 mL d'eau millipore
- Ajuster le pH à 6,5 avec du HCl concentré.
- Transvider dans un ballon de 100 mL et ajuster au trait de jauge avec de l'eau millipore.
- Préparer cette solution le jour même.

#### **Tampon universel acide (pH 6.5), pour 40 échantillons :**

- Mélanger dans un bécher de 300 mL

- 50 mL de Tampon universel
- 125 mL d'eau millipore
- Ajuster le pH à 6,5 avec du HCl concentré.
- Transvider dans un ballon de 250 mL et ajuster au trait de jauge avec de l'eau millipore.
- Préparer cette solution le jour même.

**Solution acide de substrat pour une analyse (11,5mM) dans le tampon, pour 20 échantillons :**

- Peser 106.7 mg de *disodium 4-nitrophény-phosphate* dans un bécher de 25 mL.
- Diluer dans le tampon acide et transvider dans un ballon de 25 mL.
- Ajuster le volume au trait de jauge avec le tampon.
- Préparer la solution le jour même et mettre à l'abri de la lumière. **Attention!** Le substrat est sensible à la lumière et à la température.

**Solution acide de substrat pour une analyse (11,5mM) dans de l'eau, pour 20 échantillons:**

- Peser 106.7 mg de *disodium 4-nitrophény-phosphate* dans un bécher de 25 mL.
- Diluer dans de l'eau déionisée et transvider dans un ballon de 25 mL.
- Ajuster le volume au trait de jauge avec l'eau.
- Préparer la solution le jour même et mettre à l'abri de la lumière. **Attention!** Le substrat est sensible à la lumière et à la température.

**Solution de Chlorure de calcium  $\text{CaCl}_2$  (0,5M)**

- Dans un ballon de 500 mL, peser 36,74g de  $\text{CaCl}_2$  dihydrate.
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau millipore. **Attention!** Du chlore se libère lors de l'ajout de l'eau, faire la solution sous la hotte.

**Solution d'hydroxyde de sodium (0.5M) : (même que pour sulfatase)**

- Peser 20 g de *NaOH* dans une cupule de plastique.
- Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L et ajouter de l'eau millipore jusqu'au trait de jauge.

**Solution standard stock ( 1 mg p-nitrophenol-ml-1): même que pour sulfatase**

- Peser 0,1g de *p*-nitrophenol dans une cupule de plastique.
- Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 100 mL.
- Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau millipore.
- Garder cette solution à 4°C dans un contenant ambré.

#### **Standard de travail pour une courbe de calibration (20 µg p-nitrophenol·mL<sup>-1</sup>) :**

- Pipeter 0,5 mL avec une micropipette P1000 de la solution stock dans un ballon de 25 mL.
- Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau millipore.
- Transvider dans un bécher.
- Garder cette solution à 4°C dans un contenant ambré.

#### **Méthode**

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Ajouter les réactifs, 3) Centrifuger le surnageant, 4) Préparer la courbe de calibration et mesurer l'absorbance photométrique des échantillons centrifugés.

#### **Préparation du sol et incubation avec substrat**

- Peser 1,00g ± 0,05 de sol humide dans 5 erlenmeyers de 100 mL.
- Avec une dispensette de 10 mL, ajouter 4mL du tampon acide dans les 5 erlenmeyers.
- Avec une P1000, ajouter 1 mL de la solution de substrat dans 3 des 5 erlenmeyers seulement (échantillons). Les 2 autres erlenmeyers sans substrat serviront de contrôle.
- Agiter brièvement, sceller et incuber pour **2h à 37°C**.

#### **Standard de calibration :**

- Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL du standard de travail dans des erlenmeyer de 50 mL.
- Ajuster les volumes à 5 mL avec de l'eau millipore en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0 mL avec une P5000 ou une pipette automatique.
- Ajouter 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,5M). Il est important d'ajouter le CaCl<sub>2</sub> avant le NaOH
- Ajouter 4 ml avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium (0,5M).
- Agiter et transférer le surnageant dans des tubes Eppendorf de 2mL.

- Centrifuger à 20 000g pendant 5 min.
- Les standards de calibration contiennent 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg de p-nitrophenol par mL.

### Préparation du filtrat après incubation

- Avec une dispensette de 10 mL, ajouter 1 mL de chlorure de calcium dans les 5 erlenmeyers. Attention il est très important d'ajouter le CaCl<sub>2</sub> avant le NaOH.
- Avec une dispensette de 10 mL, ajouter 4 mL de NaOH (0,5M) dans les 5 erlenmeyers.
- Avec une P1000, ajouter 1 mL de solution de substrat dans les contrôles.
- À l'aide d'une dispensette de 100mL, ajouter 90 mL d'eau distillée dans les 5 erlenmeyers
- Agiter les erlenmeyers.
- Transférer le surnageant dans des tubes Eppendorf de 2mL et centrifuger à 20 000g pendant 5 min.

### Analyses photométrique du filtrat Analyses photométrique du filtrat

- Pipeter 250 µL des échantillons centrifugés avec une pipette P1000 dans les puits de la microplaque.
- Mesurer l'extinction à **420 nm** avec un spectrophotomètre contre le blanc.

### 3. CALCUL

Calculer les concentrations of p-nitrophenol (pNP) à partir des courbes de calibration.

$$\frac{(S-C)*V*D}{PS} = \mu\text{g pNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot 2\text{h}^{-1}$$

PS

S valeur moyenne des échantillons ( µg pNP/mL)

C valeur moyenne des contrôles (µg pNP/mL)

V volume de solution d'incubation= 10mL

(1 mL substrat + 4mL tampon + 1mL CaCl<sub>2</sub> + 4 mL NaOH)



D	Facteur de dilution $D=10$ car on a ajouté 90 mL d'eau dans la solution d'incubation (10mL)
PS	poids humide de l'échantillon (g sol humide)

## Notes



- IMPORTANT : La concentration de substrat reportée dans le livre est 115mM mais est en réalité de 11,5 mM (erreur dans le livre). Donc, une concentration de substrat à 11,5mM n'induit pas une vitesse enzymatique maximale mais est probablement suffisante pour maintenir une cinétique constante, puisque le  $K_M$  de plusieurs sols est de 1,11 à 3,40 mM (Lessard et al., 2013)
- Le substrat est sensible à la chaleur et à la lumière, les flacons doivent être recouverts d'aluminium.
- Mesurer l'extinction dans les 6 premières heures.
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 120  $\mu$ g p-nitrophenol
- L'ajustement du pH devrait se faire à 37°C puisque c'est la  $T^\circ$  d'incubation
- Utiliser plus ou moins de sol si l'activité sort de la courbe de calibration, ou est trop faible.
- Le  $\text{CaCl}_2$  est ajouté afin d'éviter l'interférence que créent les substances humiques qui se dissolvent. Il prévient aussi la dispersion de l'argile. Un précipité blanchâtre se forme lorsque le NaOH est ajouté au  $\text{CaCl}_2$
- Une corrélation négative entre l'activité de la phosphatase et le P disponible a été observée dans des sables (Nannipieri et al, 1978) et dans des sols de forêts.

## 4. RÉFÉRENCES

Kandeler, E., & Öhlinger, R. (1996). Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism. In F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler & R. Margesin (Eds.), *Methods in Soil Biology* (pp. 162-184). Berlin: Springer.

Lessard I, Renella G, Sauvé S & Deschênes L (2013) Metal toxicity assessment in soils using enzymatic activity: Can water be used as a surrogate buffer? *Soil Biol Biochem* 57: 256-263.

## Annexe 6: Mesure de la fraction labile de zinc dans le tampon et dans l'eau après incubation

 <b>CIRAIG</b> Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
			
Protocole # :PE70-F		Nombre de pages : 9	
Version :2		Date : 23 mars 2010	
Auteur(s):Isabelle Lessard _____ _____			
Approuvé par : Lucie Jean _____ _____ _____		Signatures :                      Date : <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ _____	
Titre : Mesure de la fraction labile de zinc dans le tampon et dans l'eau après incubation			
Mots clés :    Square Waves- Anodic Stripping Voltametry (SW-ASV), spéciation, zinc, solution tampon			

**OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer la fraction labile de zinc dans diverses solutions de sols contaminés naturellement. Les sols en question sont mis en solution dans l'eau ainsi que dans quatre tampons, soit le tampon borate, le tampon tris, le tampon acétate et le tampon universel. Les mesures sont effectuées par une technique voltamétrique de redissolution anodique par impulsion d'ondes carrés symétriques (*Square Waves-Anodic Stripping Voltametry SW-ASV*).

## MATÉRIEL

- 8 ballons jaugés de 500mL
- 2 ballons jaugés de 2L
- 2 ballons jaugés de 250mL
- 2 ballons jaugés de 100mL
- 8 béchers de 500mL
- Balance
- pH-mètre
- Conductimètre
- Stand Polarographe ASV Metrohm VA663 et Voltamètre BAS100B de Bioanalytical System (Lise Rancourt, ETE-INRS Québec)
- Incubateur à 37°C
- 100 erlenmeyers de 50mL
- 50 seringues de 5mL jetable (14-283-35, Ref309650, BD Fisher)
- 100 filtres de 45µm en PVDF (SLHV033NK, Millipore, Millex HV)
- Éprouvettes de verre de 15mL
- Cuvettes d'analyse de polarographie
- Micropipette P200, P1000 et P5000
- Dispensette automatique de 10 mL
- Dispensette automatique de 100mL
- Embouts pour micropipettes
- Au moins 60g de sol
- Spatules en téflon
- Gants en nitrile
- Plat en plastique pour bain d'acide
- Tetraborate de sodium (FW 381.37, AC-8262, Anachemia)
- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (FW 121.14, BG-9596, Anachemia)
- Acétate de sodium trihydraté (FW 136.08, 79948-300, Anachemia)
- Acide malique (FW 116.08, 63190, Fluka)
- Acide citrique anhydre (FW 192.13, AC2513, Anachemia)
- Acide borique (FW 61.83, AC1309, Anachemia)

- $\text{KNO}_3$  (FW 101.11, grade extra pure 12648, Riedel-deHaën, Fluka)
- $\text{NaOH}$  (Anachemia, AC-8370)
- Acide chlorhydrique concentré (46396-460, Anachemia)

## MÉTHODOLOGIE

### LAVAGE DU MATÉRIEL

Avant de débiter l'expérience, s'assurer de bien laver toute la verrerie à l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) 10% (v/v) (cuvettes d'analyse polarographique, matériel de préparation des solutions). Pour ce faire, laver tout d'abord la vaisselle à l'aide d'un détergent doux et d'eau distillée puis rincer à l'eau déionisée. Une fois la vaisselle ainsi lavée, déposer (à l'aide de gants en nitrile) le matériel propre dans le bac de lavage à l'acide nitrique 10%(v/v) pour la nuit. Laisser tremper au moins 2 heures, sortir la vaisselle du bac à l'aide des gants et d'un bac à vaisselle et rincer trois fois à l'eau distillée et trois fois à l'eau déionisée.

### PRÉPARATION DES SOLUTIONS

#### *Tampon borate (0,1M, pH 6,5 et 10)*

- Dans deux béchers de 500mL, dissoudre 19,0685g de tetraborate de sodium dans 350mL d'eau milli-Q.
- Chauffer si nécessaire pour obtenir une dissolution complète.
- Refroidir la solution à la température de la pièce, ajuster le pH à 6,5 et à 10 avec du  $\text{HCl}$  1M ou  $\text{NaOH}$  3M.
- Transférer dans des ballons de 500mL et ajuster le volume à 500mL avec de l'eau milli-Q.

#### *Tampon tris (0,05 M, pH 6,5 et 8,1)*

- Peser 3,03g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane et transférer dans deux béchers de 500mL et ajouter 350mL d'eau MilliQ pour dissoudre.
- Ajuster le pH à 6,5 et 8,1 avec du  $\text{HCl}$  1M et du  $\text{NaOH}$  3M. Transférer dans des ballons de 500mL et jauger à 500mL avec de l'eau milli-Q.
- Garder la solution à 4°C.

***Tampon acétate (0,5M, pH 5,8 et 6,5)***

- Dans deux béchers de 500mL, dissoudre 34,02g d'acétate de sodium trihydraté dans 350mL d'eau milli-Q
- Ajuster le pH à 5,8 et 6,5 avec de l'acide acétique concentré
- Transférer dans des ballons de 500mL et ajuster le volume à 500mL avec de l'eau milli-Q.

***Tampon Universel, solution stock***

- Dans un ballon de 250 mL, dissoudre dans 125 mL d'une solution de NaOH 1M, sous la hotte:
  - 3,025 g de tri(hydroxyméthylaminométhane)
  - 2,9 g d'acide malique
  - 3,2 g d'acide citrique anhydre
  - 1,575 g d'acide borique
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau millipore.

***Tampon Universel, solution de travail (pH 6,5)***

- Mélanger dans un bécher de 500mL
- 100 mL de Tampon universel
- 250 mL d'eau millipore
- Ajuster le pH à 6,5 avec du HCl concentré.
- Transvider dans un ballon de 500mL et ajuster au trait de jauge avec de l'eau millipore.

***Solution de nitrate de potassium  $KNO_3$  0,011 M***

- Peser exactement 2,2244g de  $KNO_3$  et transférer dans un ballon de 2L.
- Ajouter de l'eau milliQ et agiter avec un barreau magnétique jusqu'à dissolution complète.
- Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau milli-Q.
- Faire à nouveau 2L de solution

***Préparation de la solution de  $KNO_3$  0,01M***

- Peser 0,5055g de nitrate de potassium et transférer dans un ballon jaugé de 500mL.
- Compléter le volume au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

***Préparation de la solution-mère Zn (4mg/L ou ppm)***

- À l'aide d'une seringue de 1mL, ajouter 1mL de solution standard Zn SPEX (1000mg/L) dans un ballon jaugé de 250mL.
- Compléter le volume jusqu'au trait de jauge avec de l'eau MilliQ.

***Préparation des solutions standard filles (40 et 80µg/L ou ppb)***

\*\*\* Les solutions standard filles pourront être utilisées pour valider la précision de la lecture au SW-ASV. Elles ne sont pas utiles pour établir la courbe de calibration.

Pour chaque solution-fille, procéder comme suit :

- Ajouter le volume de solution-mère indiqué dans le tableau ci-bas dans le ballon jaugé associé
- Compléter le volume au trait de jauge avec une solution de  $\text{KNO}_3$  0,01M.

**Tableau A6-1 : Préparation des solutions-filles Zn à partir de la solution-mère Zn (4 µg/mL)**

Solution-fille (µg/L ou ppb)	Solution-mère Zn à prélever (mL)	Ballon jaugé (mL)
40	1	100
120	3	100

**MANIPULATIONS**

**Préparation des échantillons**

\*\*\* Pour chaque combinaison sol/tampon, les mesures devront être faites en triplicat.

- Peser 2g de sol dans un erlenmeyer de 50ml.
- Avec une dispensette automatique de 10ml, ajouter 8ml d'eau milli-Q ou de tampon.
- Agiter brièvement et sceller.
- Incuber pendant 2 heures à 37°C

### Préparation de la courbe d'étalonnage

- Pipeter 2mL du tampon directement dans une cuvette d'analyse polarographique à l'aide d'une pipette P5000
- Ajouter 18mL de solution de  $\text{KNO}_3$  0,011M avec une dispensette automatique de 100mL. La concentration en  $\text{KNO}_3$  finale de l'étalon sera donc de 0,01M.
- Après avoir purgé à l'azote, faire 3 lectures de cette solution (blanc).
- Ajouter le volume de solution-mère Zn indiqué à la ligne E1 du tableau ci-dessous directement dans la cellule (4 mg/L) à l'aide d'une pipette P200.
- Après la purge, faire la lecture de ce premier étalon (E1).
- Refaire les étapes 4 et 5 pour les autres étalons E2 à E5.
- Mesurer le pH et la conductivité électrique du dernier étalon après la lecture.
- Faire une courbe d'étalonnage par tampon; un tampon à deux pH différents équivaut donc à deux courbes d'étalonnage distinctes.

**Tableau A6-2 : Étalons préparés par ajout dosé pour la courbe de calibration du Zn labile déterminé par DP-ASV**

Étalon	Solution-mère ajouté au blanc	Zn	[Zn]	Lecture	Position
	$\mu\text{L}$		ppb	$\text{nA/cm}^2$	mV
Blanc	0		0		
E1	200		39,6		
E2	200		78,4		
E3	400		153,8		
E4	400		226,4		
E5	500		313,4		

### Filtration des solutions de sol

- Prélever le surnageant après incubation à l'aide d'une seringue de 5mL (une seringue par sol), visser un filtre de 0,45 $\mu\text{m}$  et filtrer au moins 2mL du surnageant dans une éprouvette de verre de 15 mL neuve. Changer de filtre et rincer la seringue entre chaque échantillon.

- Pipeter 2mL du filtrat directement dans une cuvette d'analyse polarographique à l'aide d'une pipette P5000
- Ajouter 18mL de solution de  $\text{KNO}_3$  0,011M avec une dispensette automatique de 100mL. La concentration en  $\text{KNO}_3$  finale de l'échantillon sera donc de 0,01M.

### Lecture au polarographe SW-ASV

- Analyser l'échantillon au polarographe
- Mesurer l'aire du pic et sa position
- Mesurer le pH et la conductivité électrique de l'échantillon après lecture et vérifier s'ils sont équivalents à la courbe d'étalonnage.
- Noter tous les paramètres fixés pour la pré-concentration, le temps de repos, la redissolution du zinc : le diamètre de la goutte de mercure, le temps de purge à l'azote, potentiel de départ et potentiel final, vitesse de balayage voltamétrique, amplitude d'impulsion (*paper drive*), temps de pré-concentration, etc.

### RÉFÉRENCES

Florence, 1986 T.M. Electrochemical approaches to trace element speciation in waters—A Review, *Analyst* **111** (1986), pp. 489–505.

Stephan, C. H., F. Courchesne, et al. (2008). "Speciation of zinc in contaminated soils." *Environmental Pollution* **155**(2): 208-216.

### NOTES

- Il est essentiel que la force ionique et le pH des échantillons et de la courbe standard associée soient équivalents (Florence, 1986).
- Dans Stephan (2008) :

$$[\text{Zn total dissous}] = [\text{Zn inorganique}] + [\text{complexe dissous organique-Zn}]$$



Où [Zn labile ASV] associé à [Zn inorganique]

Et [Zn labile ASV] =  $\text{Zn}^{2+}$  + [Paire inorganique-Zn]

Paire inorganique : carbonate, hydroxyde, nitrate et sulfate

- Il ne faut pas acidifier les filtrats destinés à la détermination du Zn labile car l'ajout d'acide pourrait dissocier le zinc associé à la matière organique dissoute.
- Coordonnée de l'agente de recherche :

Lise Rancourt, Agent de recherche, chimiste, M. Sc.

[lise.rancourt@ete.inrs.ca](mailto:lise.rancourt@ete.inrs.ca)

Institut National de la Recherche Scientifique

Centre - Eau Terre Environnement

490 De La Couronne

Québec (Québec)



G1K 9A9

Tél: (418) 654-2630

fax: (418) 654-2600

<http://www.ete.inrs.ca>

## Annexe 7: Extraction d'une solution de sol pour analyse du zinc total en solution et du zinc labile

 <b>CIRAIG</b> Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
			
Protocole # :PE70-H		Nombre de pages :6	
Version :1		Date :Février 2009	
Auteur(s): <u>Isabelle Lessard</u> _____ _____			
Approuvé par : Lucie Jean _____ _____ _____		Signatures :                      Date : <input checked="" type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ _____	
Titre : Extraction d'une solution de sol pour analyse du zinc total en solution et du zinc labile.			
Mots clés :      Spéciation, zinc, solution de sol, voltamétrie SW-ASV, ICP-MS			

**OBJECTIF**

Ce protocole explique les étapes à suivre pour extraire une solution de sol représentative des solutions de sol dans la nature. L'extraction se fait avec une solution faiblement saline de nitrate de potassium. Cette solution a été choisie afin de maintenir une force ionique minimale et constante nécessaire aux analyses de zinc labile au polarographe SW-ASV et afin d'utiliser une extraction plus représentative des solutions de sol in situ qu'une extraction à l'eau (Stephan, Courchesne et al. 2008). Le pH du sol est aussi mesuré dans un rapport 1 :2 de solution faiblement saline.

## MATÉRIEL

- $\text{KNO}_3$  grade extra pure (12648, Riedel-deHaën, Fluka, FW=101.10g/mol)
- $\text{HNO}_3$  grade environnemental (62764-460, Anachemia)
- Solution standard Zn 1000  $\mu\text{g/mL}$  (PLZN2-2Y, SPEX, CAS Zn 7440-66-6, CAS  $\text{HNO}_3$  7697-37-2)
- 3 tubes blancs de 50mL (42mL réel) en polypropylène par sol (05-529-1D, Nalgène, Fisher)
- 3 tubes bleus de 50mL en polypropylène par sol (06-443-20, Fisher)
- Spatules en téflon
- Dispensette de 100mL
- Ballon jaugé de 2L
- Ballon jaugé de 250mL
- 2 ballons jaugés de 100mL
- Ballon jaugé de 50mL
- Filtre de 45 $\mu\text{m}$  en PVDF (SLHV033NK, Millipore, Millex HV)
- Seringue de 5 mL jetable (14-283-35, Ref309650, BD Fisher)
- Seringue Hamilton de 1 mL et 5 mL
- Pipettes automatiques P200 et P1000
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- Balance précision 0.0001 (Mettler toledo, AB204, Suisse);
- Stand Polarographe ASV Metrohm VA663 et Voltamètre 100B de Bioanalytical System (Lise Rancourt, ETE-INRS Québec)
- Spectromètre d'adsorption atomique à la flamme FAAS (Manon Leduc, Laboratoire CGM, Polytechnique)
- Spectromètre ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy) (Hélène Lalande, Campus McDonald, McGill)
- Centrifugeuse Beckman, rotor modèle J2-21 (Palo Alto, Californie)
- Agitateur Wrist Action (Burrell, Pittsburgh, CA)

## MÉTHODOLOGIE

### Préparation du matériel

- Laisser tremper les tubes à centrifuger blancs et bleus, les spatules en téflon et les ballons jaugés pendant au moins 2h dans l'acide nitrique 10% (préféablement une journée).
- Rincer ce matériel 3 fois à l'eau distillée et trois fois à l'eau déionisée.

### Préparation de la solution de $\text{KNO}_3$ 0.01M

- Peser 2.0220g de nitrate de potassium et transférer dans un ballon jaugé de 2L.
- Compléter le volume au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

### Extraction du zinc total en solution

- Peser exactement 12.50g de sol directement dans un tube à centrifuger de 50mL (tube blanc en polypropylène) préalablement lavé à l'acide. Noter le poids et réaliser les manipulations en triplicata pour chaque sol.
- Ajouter 25mL de  $\text{KNO}_3$  0.01M à l'aide d'une dispenseuse de 100mL préalablement calibrée. Noter le poids de la solution ajoutée.
- Dans un tube vide, ajouter aussi 25mL de  $\text{KNO}_3$  0.01M (blanc).
- Fermer les tubes et les agiter pendant 16h à l'aide d'un agitateur de type Wrist Action.
- Centrifuger à 10,000g pour 10 min.
- Prendre la mesure du pH du surnageant selon le PSO-A5 version2.
- Prélever le surnageant à l'aide d'une seringue de 5mL (une seringue par sol), visser un filtre de 0,45µm et filtrer 25mL du surnageant dans un tube bleu à centrifuger de 50mL préalablement lavé à l'acide. Changer de filtre et rincer la seringue entre chaque échantillon.
- Ajouter 0,74mL d'acide nitrique concentré grade environnemental pour acidifier la solution à 2% volumique.
- Analyser les échantillons au FAAS pour le zinc total en solution au Laboratoire de Géochimie Analytique local B-647 Département des génies Civil, Géologique et des Mines (CGM) de l'École Polytechnique de Montréal.

### Extraction du zinc labile

- Faire les étapes □ à □
- Ne pas acidifier le filtrat.
- Analyser les échantillons au polarographe DP-ASV le plus tôt possible, idéalement la journée même (Laboratoire de chimie analytique environnementale de l'UdeM, Pavillon principal, F-625).

### Préparation de la solution-mère Zn (4mg/L ou ppm)

- À l'aide d'une seringue de 1mL, ajouter 1mL de solution standard Zn SPEX (1000mg/L) dans un ballon jaugé de 250mL.
- Compléter le volume jusqu'au trait de jauge avec une solution de  $\text{KNO}_3$  0.01M.

### Préparation des solutions standard filles (40, 80 et 400 µg/L ou ppb)

\*\*\* Les solutions standard filles pourront être utilisées pour valider la précision de la lecture au SW-ASV. Elles ne sont pas utiles pour établir la courbe de calibration.

Pour chaque solution-fille, procéder comme suit :

- Ajouter le volume de solution-mère indiqué dans le tableau ci-bas dans le ballon jaugé associé
- Compléter le volume au trait de jauge avec une solution de  $\text{KNO}_3$  0.01M.

**Tableau A7-1 : Préparation des solutions-filles Zn à partir de la solution-mère Zn (4 µg/mL)**

Solution-fille Zn (µg/L ou ppb)	Solution-mère Zn à prélever (mL)	Ballon jaugé utilisé (mL)
40	1	100
80	2	100
400	5	50

### Préparation de la courbe de calibration pour le polarographe SW-ASV

- Dans une cellule d'analyse propre, ajouter 20mL de solution  $\text{KNO}_3$  0.01M à l'aide d'une dispensette automatique.
- Après avoir purgé à l'azote, faire 3 lectures de cette solution (blanc).

- Ajouter le volume de solution-mère Zn indiqué à la ligne E1 du tableau ci-dessous directement dans la cellule (4 mg/L) à l'aide d'une pipette P200 ou P1000.
- Après la purge, faire la lecture de ce premier étalon (E1).
- Refaire les étapes □ et □ pour les autres étalons E2 à E5.

**Tableau A7-2 : Étalons préparés par ajout dosé pour la courbe de calibration du Zn labile déterminé par SW-ASV**

Étalon	Solution-mère Zn ajouté au blanc	[Zn]	Lecture	Position
	µL	µg/L	nA/cm <sup>2</sup>	mV
Blanc	0	0		
E1	200	39,6		
E2	200	78,4		
E3	500	172,2		
E4	1000	347,0		
E5	1000	506,6		

## RÉFÉRENCE(S)

Stephan, C. H., F. Courchesne, et al. (2008). "Speciation of zinc in contaminated soils." Environmental Pollution 155(2): 208-216.

## RECOMMANDATION(S)

$$[\text{Zn total dissous}] = [\text{Zn inorganique}] + [\text{complexe dissous organique-Zn}]$$

Où [Zn labile ASV] associé à [Zn inorganique]

$$\text{Et } [\text{Zn labile ASV}] = \text{Zn}^{2+} + [\text{Paire inorganique-Zn}]$$



Paire inorganique principales : carbonate, hydroxyde, nitrate et sulfate

- Il ne faut pas acidifier les filtrats destinés à la détermination du Zn labile car l'ajout d'acide pourrait dissocier le zinc associé à la matière organique dissoute.
- Coordonnées des agentes de recherche :

Hélène Lalande, room MS2-065  
Coordinator, Environmental Chemistry Lab Natural Resource Sciences  
Department McGill University, Macdonald Campus  
(514) 398-7945 FAX (514) 398-7990  
[helene.lalande@mcgill.ca](mailto:helene.lalande@mcgill.ca)

Lise Rancourt, Agent de recherche, chimiste, M. Sc.  
[lise.rancourt@ete.inrs.ca](mailto:lise.rancourt@ete.inrs.ca)  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Centre - Eau Terre Environnement  
490 De La Couronne  
Québec (Québec)  
G1K 9A9  
Tél: (418) 654-2630  
fax: (418) 654-2600  
<http://www.ete.inrs.ca>

## Annexe 8: Extraction de la matière organique dissoute (DOC) dans des sols par une solution saline fortement ionique

 <b>CIRAIG</b> Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
			
Protocole # :PE70-I		Nombre de pages :5	
Version :2		Date :Mai 2011	
Auteur(s): <u>Isabelle Lessard</u> _____ _____			
Approuvé par : Lucie Jean _____ _____ _____		Signatures :                      Date : <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ _____	
Titre : Extraction de la matière organique dissoute (DOC) dans des sols par une solution saline fortement ionique			
Mots clés : DOC, sol, extraction, KNO <sub>3</sub>			

### OBJECTIF

Le carbone organique dissout (*Dissolved Organic Carbon*, DOC) est généralement définie comme la matière organique en solution de diamètre inférieur à 0.45µm, quoique certaines recherches ont été conduites avec des filtres de porosité variable (Chow, Guo, Gao, Breuer, & Dahlgren, 2005). La DOC est considérée comme la fraction la plus active de la matière organique totale et joue un rôle important dans plusieurs processus biogéochimiques du sol.



Il existe plusieurs techniques d'extraction de DOC. La collecte *in situ* de solution de sol peut être faite grâce à l'utilisation de lysimètre (Soil Solution Organic Matter, SSOM). Lorsque la collecte *in situ* est impossible, l'extraction à l'eau ou à l'aide de solution saline faible s'avère être une technique-substitue acceptable pour extraire la matière organique en solution (Water-Extractable Organic Matter, WEOM) (Carter & Gregorich, 2008).

L'extraction DOC peut aussi utilisée une matrice saline fortement ionique (Salt-Extractable Organic Matter, SEOM); l'extrait contient alors la matière organique présente dans la solution de sol et une fraction additionnelle de matière organique désorbée et/ou dissoute. Cette fraction supplémentaire semble être plus biodégradable que la fraction organique présente seulement dans la solution de sol collectée *in situ*. Elle ne peut donc pas être considérée comme une technique-substitue de SSOM ou WEOM, mais elle est souvent utilisée pour estimer la matière organique facilement disponible aux hétérotrophes du sol (Carter, et al., 2008).

Le choix de la solution saline est aussi très important. Plusieurs solutions sont utilisées en littérature pour l'extraction de la DOC, comme  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , selon le contexte des analyses. Cependant, l'ion Ca a une forte tendance à flocculer alors que le K a un haut pouvoir dispersant (inverse de la floculation). Ainsi, une solution saline dont le cation est le Ca aura tendance à faire flocculer la DOC alors qu'une solution saline composée de K aura plutôt tendance à garder la DOC en solution. De plus, les chlorures interfèrent souvent avec les méthodes analytiques. Par exemple, l'analyseur DOC (Sievers 5310C, Laboratory TOC Analyser) utilisé dans cette procédure est sensible aux chlorures dont la concentration dépasse 0,01M car ceux-ci interfèrent avec le réacteur UV de l'appareil (voir Annexe). De plus, les chlorures se lient plus facilement aux métaux et aux autres cations (acides humiques et fulviques) de la solution que les nitrates (Sauvé, 2001).

À partir de l'ensemble de ces observations, la solution saline retenue pour cette procédure est une solution de  $\text{KNO}_3$  0,01M afin d'éviter la floculation de la DOC et des interférences analytiques ou des liaisons entre les chlorures et les acides humiques cationiques du sol. De plus, cette solution constitue la même solution d'extraction utilisée pour la quantification du zinc soluble et du zinc labile.

## MATÉRIEL

- $\text{KNO}_3$  grade extra pure (12648, Riedel-deHaën, Fluka,  $\text{FW}=101.10\text{g/mol}$ )
- Bain d'acide nitrique 10% v/v
- 3 tubes bleus de 50mL en polypropylène par sol (06-443-20, Fisher)
- 3 fioles d'entreposage de la solution de sol de 40 ml en verre par sol (03-340-119, Fisher Scientific)
- Montage de filtration sous vide par échantillon (entonnoir Buchner et erlenmeyer 250mL avec bras à vide)
- Filtres en polycarbonate (Millipore, Filtre isopore, HTTP04700,  $0,4\text{ }\mu\text{m}$ )
- Centrifugeuse Sorvall RC-6 Plus avec rotor (Thermo Scientific)
- Agitateur rotatif (Innova 2300, New Brunswick Scientific)
- Four à haute température pour conditionnement de la verrerie à  $500^\circ\text{C}$  (FB 1400, Thermolyne Corporation)
- Analyseur DOC (Sievers 5310C, Laboratory TOC Analyser de GE au laboratoire Michèle Prévost, technicienne Jacinthe Mailly, Département de Génie Civile, Polytechnique)

## MÉTHODOLOGIE

### Lavage du matériel en plastique

Avant de débiter l'expérience, s'assurer de bien laver tout le matériel en plastique à l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) 10% (v/v) (entonnoirs Buchner pour montage à filtration sous vide). Pour ce faire, laver tout d'abord la vaisselle à l'aide d'un détergent doux et d'eau distillée puis rincer à l'eau déionisée. À l'aide de gants en nitrile, déposer ensuite le matériel propre dans le bac de lavage à l'acide nitrique 10% (v/v) pour la nuit. Laisser tremper au moins 2 heures, idéalement 24h, sortir la vaisselle du bac à l'aide des gants et d'un bac à vaisselle et rincer trois fois à l'eau distillée et trois fois à l'eau déionisée. Laisser sécher à l'air.

### Conditionnement de la verrerie

Avant de débiter l'expérience, il est important de conditionner la verrerie pour enlever toute trace de carbone résiduel. Pour ce faire, mettre au four à  $500^\circ\text{C}$  pendant 4h les erlenmeyers 250mL avec bras à vide et les fioles d'entreposage de la solution de sol extraite. Laisser ensuite refroidir graduellement jusqu'à atteindre la température ambiante pour éviter le craquement de la verrerie.

### Préparation de la solution de $\text{KNO}_3$ 0,01M

- Peser 2.0220g de nitrate de potassium et transférer dans un ballon jaugé de 2L.
- Compléter le volume au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

### Extraction du DOC de sol

- Peser environ 3,0000g de sol (1,5000g pour les sols contenant >8% COT) directement dans un tube à centrifuger de 50mL (tube bleu en polypropylène). Noter le poids et réaliser les manipulations en triplicata pour chaque sol.
- Ajouter 30mL de solution saline  $\text{KNO}_3$  0,01M à l'aide d'une dispensette de 100mL préalablement calibrée. Noter le poids de la solution ajoutée.
- Dans un tube vide, ajouter aussi 30mL de la solution  $\text{KNO}_3$  (blanc). En faire au moins 1 par 12 échantillons.
- Fermer les tubes, les fixer à plat sur un agitateur rotatif et les agiter pendant 30min à 160 rpm.
- Centrifuger les échantillons à 8,000g pour 10 min.
- Pendant ce temps, conditionner les filtres en polycarbonate en y filtrant 1L d'eau ultrapure.
- Filtrer le surnageant sous vide avec les filtres conditionnés et transférer le filtrat dans les fioles en verre préalablement conditionnées.
- Conserver les échantillons à 4°C jusqu'à analyse (moins d'une semaine).
- Analyser les échantillons avec un appareil TOC (Sievers 5310C) pour la DOC en solution au Laboratoire de Michèle Prévost, Département de génie civil, Polytechnique.

### RÉFÉRENCE(S)

Carter, M. R., & Gregorich, E. G. (Eds.). (2008). *Soil Sampling and Methods of Analysis* (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group.

Chow, A. T., Guo, F., Gao, S., Breuer, R., & Dahlgren, R. A. (2005). Filter pore size selection for characterizing dissolved organic carbon and trihalomethane precursors from soils. *Water Research*, 39(Compendex), 1255-1264.

Sauvé, S. (2001). Chapter 2: Speciation of Metals in Soils. In H. E. Allen, (éd.), *Bioavailability of Metals on Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants* (pp. 7-38): Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).

Stephan, C. H., Courchesne, F., Hendershot, W. H., McGrath, S. P., Chaudri, A. M., Sappin-Didier, V., et al. (2008). Speciation of zinc in contaminated soils. *Environmental Pollution*, 155(2), 208-216.

## **RECOMMANDATION(S)**

Le temps et le type d'agitation influence la quantité de DOC extraite. Habituellement, pour obtenir un substitut acceptable d'une solution de sol collectée *in situ*, l'échantillon dans l'eau doit être agité le plus doucement possible (agitation à l'aide d'une tige de verre 3 à 4 fois pendant 1 minute). Cependant, l'agitation choisie dans cette procédure (agitateur rotatif 160 rpm) est plus agressive. Ce choix repose sur le fait qu'une quantité plus importante de DOC sera extraite et que cette fraction correspondra davantage à la fraction facilement biodisponible extraite par une solution fortement ionique (SEOM) (Carter, et al., 2008).

Des ratios sol-solution de 1 :10 pour les échantillons minéraux ou 1 :20 pour les échantillons organiques (>8% COT) donnent des concentrations de DOC généralement comprises entre 1 et 20 mg/L pour des échantillons de sols naturels (Stephan et al., 2008).

## Annexe 9: Suivi du pH et de la concentration d'ammonium à court terme (4h) pour l'uréase contenue dans un sol

 <b>CIRAIG</b> Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
			
Protocole # :PE70-J		Nombre de pages : 5	
Version :1		Date :2013-12-16	
Auteur(s):Isabelle Lessard _____ _____			
Approuvé par : Lucie Jean _____ _____ _____		Signatures :                      Date : <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ _____	
Titre : Suivi du pH et de la concentration d'ammonium à court terme (4h) pour l'uréase contenue dans un sol			
Mots clés : Uréase, pH, ammonium, sol.			

### OBJECTIF

Certaines études démontrent que le pH s'alcalinise avec une augmentation de la concentration d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), le principal produit de la réaction de l'urée par l'uréase (Yingjie Qin & Cabral, 1994; Yingjie Qin & Cabral, 2002). Cette constatation est à l'origine de l'utilisation de tampon lors d'essais enzymatiques, puisque l'activité enzymatique est fonction du pH (Tabatabai, 1994). Cependant, le sol possède une capacité tampon importante qui atténue les variations de pH résultant des fluctuations

d'électrolytes dans la solution du sol. De plus, les concentrations d'uréase et/ou d'ammonium dans un sol sont peut-être trop faibles pour observer une élévation du pH. Afin de vérifier si le pH varie dans le temps lors d'essais enzymatiques réalisés sans tampon, ce protocole a pour but de suivre l'évolution du pH et de la concentration d'ammonium dans le temps dans des sols incubés dans de l'eau en présence d'urée (suivi de l'uréase).

## MATÉRIEL

- Environ 400g de sol
- 5 ballons de 50 mL
- 60 erlenmeyers de 50 mL
- Tubes eppendorf
- Pipettes P20, P200, P1000, P5000 et automatique
- Dispensette de 100mL
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- Microplaque à fond plat transparente (Costar 96wells, Fisher)
- Lecteur microplaque (GENios, Tecan)
- Incubateur tempéré à 37°C
- Balance  $\pm 0,0001$  (Mettler Toledo)

## MÉTHODE

Le suivi du pH et de l'ammonium se fait aux 20 minutes pendant 4h, avec 3 échantillons + 2 contrôles à chaque intervalle de temps. Voir le protocole PE70-B pour la préparation des solutions. À noter qu'il n'est pas nécessaire de préparer du tampon borate.

Pour 60 échantillons, il faut préparer :

Tableau A9-1 : Volume des solutions à préparer

Solution	Volume à préparer (mL)
Substrat (Urée 720mM)	250
KCl (1M)	3L
Salicylate de sodium	25
Réactif A	75
Réactif B	25
Chaque standard	50

**Préparation des standards de calibration :**

- Avec une P1000 et P5000, pipeter 0 (blanc), 0.5, 0.75, 1 et 1.25mL de solution stock ( $1000\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$ ) dans des ballons de 50 mL et ajuster le volume au trait de jauge avec la solution de chlorure de potassium.
- Les standards contiennent 0, 10, 15, 20 et 25  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N mL}^{-1}$

**Préparation du sol et incubation avec substrat**

- Peser 4g de sol humide dans 60 erlenmeyers de 50 mL.
- Avec une dispensette de 100ml préalablement calibrée, ajouter 16mL d'eau millipore dans tous les erlenmeyers.
- Agiter et laisser reposer au moins 30 minutes et prendre le pH d'une dizaine d'échantillons (leur pH devrait être similaire).
- Avec une pipette automatique de 5mL, ajouter 2mL de la solution de substrat dans trois erlenmeyers sur cinq (échantillons). Les échantillons incubés sans substrat serviront de contrôles.
- Agiter brièvement, sceller et incuber à 37°C. Noter l'heure de départ de l'incubation

**Suivi du pH dans le temps**

- Sortir une série d'erlenmeyers (3 échantillons et 2 contrôles) à toutes les 15 minutes pour un total de 4h d'analyse.
- Pour chaque série, mesurer le pH de tous les échantillons et des contrôles. Noter l'heure pour chaque mesure.

**Suivi de la concentration d'ammonium dans le temps**

- Lorsque le pH a été mesuré et noté, ajouter 24mL de KCl dans tous les échantillons à l'aide d'une dispensette de 100mL préalablement calibrée.
- Bouchonner et mélanger à 100 rpm pendant 30 minutes sous agitateur rotatif.
- Transférer la solution des échantillons dans les tubes eppendurf et centrifuger à 10 000g pour 5 minutes.
- Pipeter 20  $\mu\text{L}$  des surnageants dans les puits de la microplaque avec une pipette P20.

- Pour chaque série de 5 échantillons, prélever aussi 20  $\mu\text{L}$  de chaque standard (0, 10, 15, 20 et 25  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N mL}^{-1}$ ). Il y aura donc une courbe de calibration propre à chaque série.
- À l'aide d'une pipette P200, ajouter 180  $\mu\text{L}$  d'eau distillée, 100  $\mu\text{L}$  du réactif A et 40  $\mu\text{L}$  de réactif B (solution de dichloroisocyanurate) dans les puits à tour de rôle.
- Bien mélanger et laisser colorer pendant 30 minutes à la température ambiante.
- Lire dans le lecteur microplaque à 685 nm. Noter l'heure de lecture.

## CALCULS

Calculer les concentrations à partir de la courbe de calibration

$$\frac{(S-C) \cdot V}{PS} = \mu\text{g NH}_4^+\text{-N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$$

PS

S valeur moyenne des échantillons (  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N mL}^{-1}$  )

C valeur moyenne des contrôles (  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N mL}^{-1}$  )

V volume de solution d'incubation = 42mL

(16 mL eau+2mL substrat+24mL KCl)

PS poids sec du sol (g)

## NOTES

- Si nécessaire les filtrats peuvent être entreposés pendant une nuit à 4°C
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 3.5  $\mu\text{g N} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Si l'intensité de la couleur des filtrats n'est pas dans cette limite, ils doivent être dilués avec de l'eau distillée.
- Le complexe coloré est stable pendant 8 heures.
- Avec l'ajout des réactifs A et B et de l'eau dans le puits, les standards contiennent 0, 0.588, 0.882, 1.176 et 1.471  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N mL}^{-1}$  respectivement.



## REFERENCES



Protocole de l'uréase PE70-B, projet d'Isabelle Lessard

Qin, Y., & Cabral, J. M. S. (1994). Kinetic studies of the urease-catalyzed hydrolysis of urea in a buffer-free system. *Applied biochemistry and biotechnology*, 49, 217-240.

Qin, Y., & Cabral, J. M. S. (2002). Properties and applications of urease - Review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(1), 1-14.

Tabatabai, A. (1994). Soil Enzymes. In S. S. S. o. America (Ed.), *Methods in Soils Analysis Part 2: Microbiological and Biochemical Properties* (2nd ed., Vol. 5, pp. 775-833). Madison: Soil Science Society of America.

## Annexe 10: Mesure de l'activité de l'invertase dans un sol.

 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; text-align: left;"> <b>CIRAIG</b>  <small>Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services</small> </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> <b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b> </div>											
											
Protocole # :PE70-K	Nombre de pages :7										
Version :1	Date :01/11/10										
Auteur(s): Isabelle Lessard _____ _____											
Approuvé par : Lucie Jean _____ _____ _____	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Signatures :</th> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Date :</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> _____</td> <td style="padding: 5px;">_____</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> _____</td> <td style="padding: 5px;">_____</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> _____</td> <td style="padding: 5px;">_____</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">_____</td> <td style="padding: 5px;">_____</td> </tr> </table>	Signatures :	Date :	<input type="checkbox"/> _____	_____	<input type="checkbox"/> _____	_____	<input type="checkbox"/> _____	_____	_____	_____
Signatures :	Date :										
<input type="checkbox"/> _____	_____										
<input type="checkbox"/> _____	_____										
<input type="checkbox"/> _____	_____										
_____	_____										

Titre : Mesure de l'activité de l'invertase dans un sol
Mots clés : Invertase, enzymes, activité enzymatique

**OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique de l'invertase dans un sol contaminé par un métal. Cette enzyme est liée au cycle du carbone. L'invertase hydrolyse en monosaccharides le sucrose, un disaccharide de glucose-fructose présent dans les plantes et plus facilement hydrolysable que les autres disaccharides. L'invertase est produite par plusieurs microorganismes du sol incluant les bactéries, les fungi et les levures. L'essai de l'invertase est le seul

protocole enzymatique lié au cycle du carbone utilisant un substrat naturellement présent dans le sol (Stuczynski, McCarty et al. 2003).

Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenues dans les sols, ce protocole mesure un potentiel d'activité enzymatique; on introduit dans un échantillon de sol le substrat ciblé par l'enzyme testé et on mesure après une période d'incubation les produits de la transformation enzymatique. De l'eau millipore est utilisée pour la préparation de toutes les solutions puisque le projet est réalisé dans le contexte d'une contamination métallique et qu'il est important d'utiliser des solutions exemptes de métaux. Ce protocole inclut aussi l'analyse de l'activité enzymatique sans tampon, correspondant à l'activité enzymatique 'réelle' du sol (Kandeler and Öhlinger 1996); les autres conditions expérimentales ne sont pas modifiées (température, substrat, temps d'incubation, etc.). Les essais avec et sans tampon sont réalisés en parallèle pour chaque sol testé.

## **MATÉRIEL**

- 10 erlemeyers de 125 mL par microcosme
- 2 ballons de 2L
- 2 ballons de 1L
- 2 ballons de 500 mL
- 1 ballon de 100 mL
- 1 ballon de 50 mL
- 1 bécher de 2L
- Tubes eppendorf de 2 mL
- Pipettes P200, P1000, P5000 et multicanaux (model 8800, Nichityo)
- Embouts à pipettes
- Dispensette de 10 mL et de 100 mL et dispensette automatique
- Microplaque à fond plat transparente (Costar 96wells, Fisher)
- Lecteur microplaque (GENios, Tecan)
- Incubateur tempéré à 50°C
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- Balance  $\pm 0.0001$  (Mettler Toledo);
- Acétate de sodium anhydre (Anachemia, 79960-380, M=82,03)
- Acide acétique glacial (Fisher, UN2789)

- Acide sulfurique (Anachemia, 88366-460, M=98,08)
- Sucrose (Fisher, S5-500, 1025)
- D-glucose anhydre (dextrose) (Sigma G-7528, M=180,16)
- Carbonate de sodium anhydre (Fisher S263-500, M=105,99)
- Cyanure de potassium (Mallinckrodt 6881, M=65,12)
- Hexacyanoferrate (III) de potassium (Aldrich 39351-7, M=329,26)
- Sulfate d'ammonium ferrique dodécahydraté (Anachemia, 40710-300)
- Sulfate de sodium dodécyl (Anachemia, BG-3950, M=288,38)

## **INVERTASE**

### **Préparation des solutions**

#### **Tampon Acétate (2M, pH 5,5)**

- Dans un bécher de 1L, dissoudre dans 164,06 g d'acétate de sodium anhydre dans 700 mL d'eau déionisée.
- Ajuster le pH à 5,5 avec de l'acide acétique concentré.
- Transvider dans un ballon de 1L et ajuster au trait de jauge avec de l'eau déionisée.

#### **Solution de sucrose 1,2% (substrat dans tampon ou eau):**

- Peser 0,6g de sucrose dans 40 mL de tampon.
- Transvider dans un ballon de 50mL et ajuster au trait de jauge avec du tampon.
- Répéter ces 2 étapes en substituant la solution tampon par de l'eau déionisée.
- Préparer ces solutions le jour même.

### **Réactif A**

- Dissoudre 8g de carbonate de sodium anhydre et 0,45g de cyanide de potassium dans un ballon de 500mL contenant environ 300mL d'eau distillée.
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

**Réactif B**

- Dissoudre 0,25g de hexacyanoferrate (III) de potassium dans un ballon de 500mL contenant environ 300mL d'eau distillée.
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée
- [Conserver cette solution dans une bouteille ambrée.](#)

**Réactif C**

- Dissoudre 3g de sulfate d'ammonium ferrique et 2g de sulfate de sodium dodecyl dans 1800 mL d'eau distillée et 8,4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré dans un bécher de 2L ;
- Chauffer à 50°C pour dissoudre ;
- Laisser refroidir ;
- Transférer dans un ballon de 2L et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

**Standard stock de glucose (250µg glucose/mL)**

- Dissoudre 0,25g de glucose anhydre avec de l'eau déionisée dans un ballon de 1L.
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

**Standard de travail pour une courbe de calibration (25 µg glucose/mL) :**

- Pipeter 5 mL avec une pipette P5000 de la solution stock dans un ballon de 50 mL.
- Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau millipore.

**Méthode**

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Centrifuger le surnageant 3) Ajouter les réactifs, 4) Préparer la courbe de calibration et mesurer l'absorbance des échantillons centrifugés.

**Préparation du sol et incubation avec substrat**

- Peser **0,50g ± 0,05g** de sol humide dans 5 erlenmeyers de 125 mL.

- Avec une dispensette automatique de 5 mL, ajouter 1,5mL du tampon acide (ou d'eau) dans les 5 erlenmeyers.
- Avec une dispensette automatique de 5 mL, ajouter 1,5 mL de la solution de substrat dans 3 des 5 erlenmeyers seulement (échantillons). Les 2 autres erlenmeyers sans substrat serviront de contrôle.
- Agiter brièvement, sceller et incuber pour **2h à 50°C**.

### **Préparation du filtrat après incubation**

- Avec une dispensette automatique de 5 mL, ajouter 1,5mL de substrat dans les 2 contrôles.
- Ajouter 87mL d'eau pour une dilution  $D=30$  et agiter.
- Transférer dans des tubes Eppendorf de 2mL et centrifuger à 20 000g pendant 2 min.
- Transférer 1mL du surnageant à l'aide d'une P1000 dans une autre éprouvette de 15mL, ajouter 1mL du réactif A et 1mL du réactif B avec une dispensette automatique, sceller, agiter et incuber 15 min dans un bain d'eau bouillante.
- Refroidir les échantillons 5min.
- Ajouter 5mL de réactif C, sceller, agiter et laisser reposer 60min pour permettre le développement de la couleur.

### **Standard de calibration :**

- Pipeter avec la pipette P1000 (blanc) 0, 0.1, 0.2, 0.4 et 0.6 mL du standard de travail dans des tubes de 15 mL.
- Ajuster les volumes à 1 mL avec de l'eau millipore avec une pipette P1000 (1, 0.9, 0.8mL...)
- Traiter les standards comme les échantillons : ajouter 1mL du réactif A et 1mL du réactif B, sceller, agiter et incuber 15 min dans un bain d'eau bouillante. Refroidir les standards 5min et ajouter 5mL de réactif C, sceller, agiter et laisser reposer 60min pour permettre le développement de la couleur.
- Les standards de calibration contiennent 0, 2.5, 5, 10 et 15 µg de glucose.

### **Analyses photométriques des échantillons et des standards de calibration**

- À l'aide d'une pipette P200, pipeter 200 µL d'échantillons et des standards dans les puits de la microplaque.

- Mesurer l'extinction à **690 nm** avec le fluoromètre contre le blanc.

## CALCUL

Calculer les concentrations de glucose équivalent (GE) à partir des courbes de calibration.

$$\frac{(S-C)*V*D}{PS} = \mu\text{g GE} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot 2\text{h}^{-1}$$

PS

S	valeur moyenne des échantillons ( $\mu\text{g GE}$ )
C	valeur moyenne des contrôles ( $\mu\text{g GE}$ )
V	volume de solution d'incubation = 3 (1,5 mL substrat + 1,5mL tampon)
D	facteur de dilution selon le volume d'eau
PS	poids sec de l'échantillon (g sol sec)

## NOTES

- La présence d'acides, de sels, d'ions ammonium, de zinc, d'argent, de manganèse, d'hydroxide, de fluorides et/ou une force ionique élevée ralentit le développement de la couleur. Il faut donc absolument analyser des échantillons dilués pour l'analyse photométrique de l'activité de cette enzyme.
- La couleur est stable seulement 30 minutes. Il faut donc faire la lecture rapidement après le développement de la couleur.
- Les solutions contenant du cyanure peuvent être inactivés par oxydation au peroxyde en milieu alcalin
- Le filtre disponible est à 660 nm. Des scans ont démontré qu'une lecture à cette longueur d'onde est quasi-optimale (voir p.91 cahier 167 pour copies des scans)



## RÉFÉRENCES

Kandeler, E. and R. Öhlinger (1996). Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism. Methods in Soil Biology. F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler and R. Margesin. Berlin, Springer: 162-184.

Stuczynski, T. I., G. W. McCarty, et al. (2003). "Response of Soil Microbiological Activities to Cadmium, Lead, and Zinc Salt Amendments." Journal of Environmental Quality **32**: 1346-1355.



## Annexe 11 : Mesure de l'activité de l'invertase dans un sol pour suivi du pH dans l'eau

 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <b>CIRAIG</b>  <small>Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services</small> </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> <b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b> </div>											
											
Protocole # :PE70-K-a	Nombre de pages :4										
Version :1	Date :23/06/11										
Auteur(s): Isabelle Lessard _____ _____											
Approuvé par : Lucie Jean _____ _____ _____	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 60%;">Signatures :</td> <td style="width: 40%;">Date :</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> _____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> _____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> _____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> </table>	Signatures :	Date :	<input type="checkbox"/> _____	_____	<input type="checkbox"/> _____	_____	<input type="checkbox"/> _____	_____	_____	_____
Signatures :	Date :										
<input type="checkbox"/> _____	_____										
<input type="checkbox"/> _____	_____										
<input type="checkbox"/> _____	_____										
_____	_____										

Titre : Mesure de l'activité de l'invertase dans un sol pour suivi du pH dans l'eau
Mots clés : Invertase, enzymes, activité enzymatique

**OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de faire le suivi du pH et de l'activité enzymatique de l'invertase incubée dans l'eau dans un sol contaminé par un métal. Pour ce faire, le pH et l'activité enzymatique de l'invertase seront réalisés à intervalle régulier (20 min) pendant 2h.

## MATÉRIEL

- 30 erlemeyers de 125 mL par microcosme
- Tubes eppendorf de 2 mL
- Pipette P1000
- Embouts à pipettes
- Dispensette de 10 mL et de 100 mL et dispensette automatique pour seringue dispensant 0,75mL
- Microplaque à fond plat transparente (Costar 96wells, Fisher)
- Lecteur microplaque (GENios, Tecan)
- Incubateur tempéré à 50°C
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- Balance  $\pm 0.0001$  (Mettler Toledo);

## SUIVI DU PH

### Préparation des solutions

- Voir protocole PE70-K

### Méthode

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Centrifuger le surnageant 3) Ajouter les réactifs, 4) Préparer la courbe de calibration et mesurer l'absorbance des échantillons centrifugés.

### Préparation du sol et incubation avec substrat

- Peser **1,00g  $\pm$  0,05g** de sol humide dans 30 erlenmeyers de 125 mL.
- Avec une dispensette automatique de 10 mL, ajouter 6mL d'eau dans les erlenmeyers.
- Agiter les erlenmeyers au vortex afin d'homogénéiser la solution de sol.
- Avec une dispensette automatique de 10 mL, ajouter 6 mL de la solution de substrat dans 18 des 30 erlenmeyers seulement (échantillons). Les 12 autres erlenmeyers sans substrat serviront de contrôle.
- Agiter brièvement, sceller et incubé à **50°C**.

## Préparation du filtrat après incubation

### À chaque intervalle de 20 minutes :

- Sortir 5 erlenmeyers de l'incubateur.
- Avec une dispensette automatique de 10 mL, ajouter 6 mL de substrat dans les contrôles.
- Ajouter 48mL d'eau pour une dilution  $D=5$  et agiter.
- Transférer dans des tubes Eppendorf de 2mL, bien les identifier et centrifuger à 20 000g pendant 2 min.
- Refaire ces étapes jusqu'à ce que tous les échantillons aient été centrifugés.
- Préparer la courbe de calibration lors du dernier intervalle de 20 minutes.

### Après la centrifugation de tous les échantillons:

- Dispenser 0,75mL d'eau dans 30 éprouvettes propres de 15mL.
- Transférer 0,25mL du surnageant des 30 échantillons à l'aide d'une P1000 dans ces éprouvettes de sorte à diluer encore 4 fois les échantillons. La dilution totale est donc de  $D=20$ .
- Ajouter 1mL du réactif A et 1mL du réactif B avec une dispensette automatique, sceller, agiter et incuber 15 min dans un bain d'eau bouillante.
- Refroidir les échantillons 5min.
- Ajouter 5mL de réactif C, sceller, agiter et laisser reposer 60min pour permettre le développement de la couleur.

## Courbe de calibration :

- Pipeter avec la pipette P1000 (blanc) 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 et 0,6 mL du standard de travail dans des tubes de 15 mL.
- Ajuster les volumes à 1 mL avec de l'eau millipore avec une pipette P1000 (1, 0,9, 0,8mL, 0,7, 0,6, 0,5 et 0,4 mL d'eau)
- Traiter les standards en même temps que les échantillons : ajouter 1mL du réactif A et 1mL du réactif B, sceller, agiter et incuber 15 min dans un bain d'eau bouillante. Refroidir les standards 5min et ajouter 5mL de réactif C, sceller, agiter et laisser reposer 60min pour permettre le développement de la couleur.
- Les standards de calibration contiennent 0, 2,5, 5, 7,5 10, 12,5 et 15  $\mu\text{g}$  de glucose.

### Analyses photométriques des échantillons et des standards de calibration

- À l'aide d'une pipette P200, pipeter 200 µL d'échantillons et des standards dans les puits de la microplaque. Attention de ne pas faire mousser les échantillons!
- Mesurer l'extinction à **690 nm** avec le fluoromètre contre le blanc.

### CALCUL

Calculer les concentrations de glucose équivalent (GE) à partir des courbes de calibration.

$$\frac{(S-C) \cdot D_i \cdot D_f}{PS} = \mu\text{g GE} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot 2\text{h}^{-1}$$

PS

S	valeur moyenne des échantillons ( µg GE)
C	valeur moyenne des contrôles (µg GE)
D <sub>i</sub>	Facteur de dilution résultant du volume de la solution d'incubation = 12 (6 mL substrat + 6mL tampon)
D <sub>f</sub>	Facteur de dilution selon le volume d'eau ajouté (D=5) et la dilution additionnelle dans les éprouvettes (D=4) donc D <sub>f</sub> = 20
PS	poids sec de l'échantillon (g sol sec)



### NOTES

- La couleur est stable seulement 30 minutes. Il faut donc faire la lecture rapidement après le développement de la couleur.
- Le filtre disponible est à 660 nm. Des scans ont démontré qu'une lecture à cette longueur d'onde est quasi-optimale (voir p.91 cahier 167 pour copies des scans)

## RÉFÉRENCES

- Kandeler, E. and R. Öhlinger (1996). Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism. Methods in Soil Biology. F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler and R. Margesin. Berlin, Springer: 162-184.
- Stuczynski, T. I., G. W. McCarty, et al. (2003). "Response of Soil Microbiological Activities to Cadmium, Lead, and Zinc Salt Amendments." Journal of Environmental Quality **32**: 1346-1355.

## Annexe 12: Digestion acide à l'eau régale pour quantifier la concentration totale de métaux dans un échantillon de sol

 <b>CIRAIG</b> Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
			
Protocole # :PE70-M		Nombre de pages : 5	
Version :1		Date :Mai 2011	
Auteur(s): <u>Isabelle Lessard</u> _____ _____			
Approuvé par : Lucie Jean _____ _____ _____		Signatures :                      Date : <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ _____	
Titre : Digestion acide à l'eau régale pour quantifier la concentration totale de métaux dans un échantillon de sol			
Mots clés : digestion, métal, ICP-MS, eau régale			

### OBJECTIF

La détermination de la concentration totale des métaux dans un sol est réalisée par digestion acide. Une digestion acide consiste à extraire quantitativement les métaux d'un sol par chauffage avec des acides concentrés. Le digestat filtré est ensuite analysé par une méthode analytique comme le spectromètre de masse à source ionisante au plasma d'argon (ICP-MS) ou le spectromètre à absorption atomique (AAS). Il existe plusieurs méthodes de digestion acide en littérature qui récupèrent à différents niveaux les métaux du sol. La méthode qui récupère tous les métaux utilise de l'acide fluorhydrique, un produit très dangereux. D'autres méthodes utilisent de l'acide nitrique concentré mélangé ou non à d'autres acides et

quantifient les métaux totaux récupérables correspondant à la quasi-totalité des métaux du sol. Celle retenue pour ce projet est une digestion acide avec eau régale, un mélange d'acide nitrique et chlorhydrique dont le digestat dilué peut être analysé au ICP-MS pour un métal ou un balayage de différents métaux. La méthode est basée sur la méthode 200.2 de l'EPA (Martin, Creed et al. 1994) et la méthode MA200Met1.2 du CEAEQ (CEAEQ 2003).

## MATÉRIEL

- Balance analytique à 0,0000g (Mettler Toledo, modèle AB-S FACT)
- Étuve (Fisher Scientific, modèle Isotemp Premium Ovens 700 series)
- Ballons de 100 ml, 250 ml et 500 ml
- Bain d'acide nitrique à 10%
- Mortier et pilon inerte en agate
- Sol contaminé certifié (SCP Science, SS-2)
- Acide nitrique concentré grade environnemental (Anachemia, 62764-460, 70%)
- Acide chlorhydrique concentré grade environnemental (Anachemia, 46396-460, 37%)
- Pipette en plastique graduée de 5 ml
- Pipette en plastique graduée de 10 ml
- Bêchers en téflon
- Verres de montre
- Spatules en téflon
- Montage de filtration sous vide par échantillon (entonnoir Buchner et erlenmeyer 250ml avec bras à vide)
- 3 tubes bleus de 50ml en polypropylène par sol (06-443-20, Fisher)
- Plaques chauffantes
- Filtre de 47mm de diamètre en microfibre de verre (Whatman GFF, 1825-047, porosité 0,7µm)
- Pince métallique pour filtre
- Spectromètre de masse à source ionisante au plasma d'argon ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy) (Hélène Lalande, Campus McDonald, McGill)

## MÉTHODOLOGIE

### Lavage du matériel en plastique et en verre

Avant de débiter l'expérience, bien laver tout le matériel en plastique et en verre à l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) 10% (v/v) (mortiers et pilons, entonnoirs Buchner pour montage à filtration sous vide, erlenmeyers 250 ml avec bras à vide, verres de montre, tubes bleus de 50 ml, spatules en téflon, béciers en téflon, verrerie de préparation des solutions, etc.). Pour ce faire, laver tout d'abord la vaisselle à l'aide d'un détergent doux et d'eau distillée puis rincer à l'eau déionisée. À l'aide de gants en nitrile, déposer ensuite le matériel propre dans le bac de lavage à l'acide nitrique 10% (v/v) pour la nuit. Laisser tremper au moins 2 heures, idéalement 24h, sortir la vaisselle du bac à l'aide des gants et d'un bac à vaisselle propre et rincer trois fois à l'eau distillée et trois fois à l'eau déionisée. Laisser sécher à l'air.

### Préparation des échantillons de sols

- Sécher environ 5g de sol dans une étuve à 60°C pour 24h.
- Tamiser le sol séché à 2 mm s'il n'a pas été tamisé sur le terrain lors de l'échantillonnage.
- Broyer le sol à l'aide du mortier et du pilon afin de l'homogénéiser. Laisser tremper le mortier et pilon au moins 2h dans le bain d'acide entre le broyage des différents échantillons de sols.

### Solution d'acide nitrique 50% (v/v)

- Dans une fiole jaugée de 250 ml contenant préalablement 60ml d'eau ultrapure, ajouter graduellement 178 ml d'acide chlorhydrique concentré avec une pipette jetable de 100 ml.  
**Attention : Toujours ajouter l'acide dans l'eau**
- Laisser refroidir et compléter au trait de jauge

### Solution d'acide chlorhydrique 20% (v/v)

- Dans une fiole jaugée de 500 ml contenant préalablement 200 ml d'eau ultrapure, ajouter graduellement 270 ml d'acide chlorhydrique concentré avec une pipette jetable de 100 ml.  
**Attention : Toujours ajouter l'acide dans l'eau**
- Laisser refroidir et compléter au trait de jauge



## Digestion des sols

- Peser précisément environ 1,0000 g de sol (0,3000 g à 0,5000 g pour les sols noirs riches en matières organiques afin d'éviter le bouillonnement et la formation d'écume du mélange acide-sol lors de la digestion) directement dans un bécher en téflon. Identifier les échantillons et noter le poids.
- Réaliser les manipulations en triplicata pour chaque sol.
- Préparer un blanc de méthode et un échantillon de sol certifié pour chaque série de 12 échantillons de sol.
- Ajouter 4 ml d'acide nitrique 50% à l'aide d'une pipette graduée de 5 ml.
- Ajouter 10ml d'acide chlorhydrique 20% à l'aide d'une pipette graduée de 10 ml.
- Couvrir le bécher avec un verre de montre et chauffer 30 minutes sur plaque chauffante à 95° ou jusqu'à observer une légère ébullition, c'est-à-dire jusqu'à ce que de petites bulles remontent à la surface. Ne pas mettre plus de 3 gros ou 4 petits bécher en téflon par plaque.
- Note : Pour obtenir une bonne température d'ébullition, faire chauffer environ 15 ml d'eau dans un bécher en téflon non couvert jusqu'à 85°C; une fois que le bécher est couvert avec le verre de montre, la température de l'acide s'élèvera à 95°C.
- Pendant ce temps, identifier le matériel pour la filtration selon le numéro inscrit sur le bécher en téflon.
- Laisser refroidir le mélange 10 minutes.
- Filtrer le digestat sous vide avec un montage Buchner muni d'un filtre dans un erlenmeyer de 250 ml en s'assurant de bien rincer le matériel (verre de montre, bécher en téflon, entonnoir Buchner) avec de l'eau ultrapure pour recueillir tout le métal digéré
- Transférer le filtrat dans un ballon jaugé de 100 ml à l'aide de la partie inférieure de l'entonnoir Buchner.
- Laisser refroidir complètement avant de jauger le volume à 100 ml.
- Transférer dans un tube bleu de 50 ml préalablement lavé à l'acide, prendre soin de bien le fermer et l'identifier.
- Faire un blanc de solution en transférant 4 ml d'acide nitrique 50% et 10 ml d'acide chlorhydrique 20% dans un tube bleu de 50 ml préalablement lavé à l'acide.
- Conserver les échantillons à 4°C pour un maximum de 6 mois.

